

Cáceres, Agustina

Desafíos en el diagnóstico de gastritis atrófica autoinmune y anemia perniciosa

**Tesis para la obtención del título de posgrado de
Especialista en Bioquímica Clínica: Área
Hematología**

Directora: Rivas Ibargüen, María Alejandra

Documento disponible para su consulta y descarga en Biblioteca Digital - Producción Académica, repositorio institucional de la Universidad Católica de Córdoba, gestionado por el Sistema de Bibliotecas de la UCC.



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Químicas

**Desafíos en el diagnóstico de Gastritis Atrófica Autoinmune y
Anemia Perniciosa**

**Trabajo Final de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Católica
de Córdoba conforme a los requisitos para obtener el título de:
Especialista en Bioquímica Clínica: Área Hematología**

por

BIOQUÍMICA AGUSTINA CÁCERES

**CÓRDOBA
2020**

Directora de Trabajo Final
Bioq. Esp. Alejandra Rivas
Co-directora de Trabajo Final
Bioq. Esp. Marcela Demarchi

Comisión de Trabajo Final
Dr. Miguel Orsilles
Bioq. Esp. Cecilia Moyano
Bioq. Esp. Pilar Meaca

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Alejandra Rivas y Dra. Marcela Demarchi por su paciencia y dedicación en la realización de la monografía.

A mi familia por el apoyo.

Al Dr. Miguel Orsilles y docentes de la carrera por su enseñanza.

Al Servicio de Laboratorio del Hospital Córdoba por brindar el apoyo en la formación de sus profesionales.

ÍNDICE TEMÁTICO

	Páginas
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTADO DE FIGURAS.....	viii
LISTADO DE TABLAS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO 1. DE LA MACROCITOSIS A LA ANEMIA MEGALOBLÁSTICA	
1.1. Macrocitosis: Aspectos generales.....	3
1.2. Significado clínico.....	4
1.3. Macrocitosis con anemia asociada.....	5
1.3.1. Anemia macrocítica no megaloblástica.....	5
1.3.2. Anemia macrocítica megaloblástica.....	8
1.3.2.1. Déficit de AF.....	8
1.3.2.2. Déficit de VITB12.....	10
1.3.2.3. Estructura y funciones de la VitB12.....	11

CAPÍTULO 2. UN COMIENZO SILENCIOSO: GASTRITIS ATRÓFICA AUTOINMUNE

2.1. Aspectos generales.....	18
2.2. GAA y déficit de hierro.....	21
2.3. GAA y asociación con otras enfermedades autoinmunes.....	24
2.4. Manifestaciones clínicas.....	25
2.5. Alteraciones hematológicas.....	26
2.6. Diagnóstico.....	27

CAPITULO 3. LA FASE FINAL: ANEMIA PERNICIOSA

3.1. Aspectos generales.....	31
3.2. Alteraciones hematológicas.....	32
3.3. Alteraciones bioquímicas.....	41
3.4. Alteraciones neurológicas.....	42
3.5. Tratamiento.....	43
CONCLUSIÓN.....	44
BIBLIOGRAFÍA.....	45

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADE	amplitud de distribución eritrocitaria
ADH	anemia por deficiencia de hierro
AF	ácido fólico
AFI	anticuerpos anti factor intrínseco
AHAI	anemia hemolítica autoinmune
AHp	anticuerpos anti Helicobacter pylori
AMM	ácido metilmalónico
AP	anemia perniciosa
APCA	anticuerpos anti-células parietales
CHCM	concentración de hemoglobina corpuscular media
CP	células parietales
EC	enfermedad celíaca
EPO	eritropoyetina
FI	factor intrínseco
GAA	gastritis atrófica autoinmune
GAS	gastrina
GB	glóbulos blancos
GB	glóbulos rojos
Hb	hemoglobina
HC	haptocorrina
HCM	hemoglobina corpuscular media
Hcy	homocisteína
HLA	antígeno leucocitario humano
Holo-TC	holotranscobalamina
Hp	Helicobacter pylori
Met	metionina

MO	medula ósea
PGI/II	pepsinógeno I / II
PLT	plaquetas
PTT	púrpura trombótica trombocitopénica
SP	sangre periférica
TC	transcobalamina
Tf	transferrina
THF	tetrahidrofolato
VCM	volumen corpuscular medio
VitB12	vitamina B12

LISTADO DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Imágen de glóbulos rojos de gran tamaño y un linfocito pequeño.....	3
Figura 2. Estructura química de la Vitamina B12.....	12
Figura 3. Absorción de la Vitamina B12.....	13
Figura 4. Metabolismo de la Vitamina B12.....	15
Figura 5. Biopsia gástrica mostrando infiltración linfocítica y biopsia gástrica normal.....	20
Figura 6. Absorción del Hierro.....	22
Figura 7. Alteraciones hematológicas en GAA.....	27
Figura 8. Inclusiones eritrocitarias: Anillo de Cabot, corpúsculo de Howell-Jolly y punteado basófilo.....	32
Figura 9. Neutrófilo hipersegmentado.....	33
Figura 10. Médula hipercelular con megaloblastos, disociación madurativa núcleo-citoplasma y metamielocitos y neutrófilos cayados gigantes...34	
Figura 11. Frotis de sangre de un paciente con anemia perniciosa y anemia hemolítica autoinmune.....	36
Figura 12. Frotis de sangre de un paciente con anemia perniciosa y microangiopatía pseudo-trombótica.....	38

LISTADO DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Macrocitosis inducida por drogas.....	7
Tabla 2. Causas principales de déficit de VitB12.....	16

RESUMEN

La anemia megaloblástica es la manifestación de un defecto en la síntesis del ADN, que compromete a todas las células del organismo con capacidad proliferativa, es decir, los precursores de las tres series hematopoyéticas, glóbulos rojos (GR), glóbulos blancos (GB) y plaquetas (PLT), como así también células no hematopoyéticas con elevado recambio celular (piel, mucosas, epitelio gastrointestinal). Este trastorno es producto de la interrupción de la síntesis del ADN, pero la síntesis de ARN y de proteínas es normal y se debe en un 95% de los casos a la deficiencia de los factores vitamínicos necesarios para su síntesis: vitamina B12 (VitB12) y ácido fólico (AF).

La causa más común de deficiencia de VitB12 dentro de los desórdenes gástricos es la gastritis atrófica autoinmune (GAA), una enfermedad autoinmune órgano-específica que afecta la mucosa del cuerpo y fundus del estómago (gastritis tipo A) que se caracteriza por la presencia en suero y jugo gástrico de anticuerpos anti-células parietales (APCA) y anti-factor intrínseco (AFI) que producen la destrucción consecutiva de las células parietales (CP) y la pérdida funcional de la mucosa gástrica. Al instaurarse la atrofia, la GAA puede progresar a su fase final más severa, la anemia perniciosa (AP).

La GAA y AP con frecuencia se desarrollan lenta y silenciosamente, sumado a la gran variedad de escenarios clínicos que pueden dificultar su diagnóstico. Las consecuencias clínicas de GAA y AP pueden ser muy graves e irreversibles si no son tratadas a tiempo, de ahí la importancia de realizar un diagnóstico precoz.

PALABRAS CLAVES: GASTRITIS ATROFICA AUTOINMUNE, ANEMIA PERNICIOSA, VITAMINA B12

ABSTRACT

Megaloblastic anemia is the manifestation of a defect in DNA synthesis, which compromises all the cells of the body with proliferative capacity, that is, the precursors of the three hematopoietic series, red blood cells (RBC), white blood cells (GB) and platelets (PLT), as well as non-hematopoietic cells with high cell turnover (skin, mucosa, gastrointestinal epithelium). This disorder is the product of the interruption of DNA synthesis, but RNA and protein synthesis is normal and is due in 95% of cases to a deficiency of the vitamin factors necessary for its synthesis: vitamin B12 (VitB12) and folic acid (AF).

The most common cause of VitB12 deficiency within gastric disorders is autoimmune atrophic gastritis (GAA), an organ-specific autoimmune disease that affects the mucosa of the body and fundus of the stomach (type A gastritis) and is characterized by the presence in serum and gastric juice of anti-parietal cell antibodies (APCA) and anti-intrinsic factor (AFI) that cause the consecutive destruction of the parietal cells (PC) and the functional loss of the gastric mucosa. As atrophy sets in, GAA can progress to its most severe end stage, pernicious anemia (PA).

GAA and AP often develop slowly and silently, in addition to the wide variety of clinical scenarios that can make diagnosis difficult. The clinical consequences of GAA and AP can be very serious and irreversible if they are not treated in time, hence the importance of making an early diagnosis.

KEY WORDS: ATROPHIC AUTOIMMUNE GASTRITIS, PERNICIOUS ANEMIA, VITAMIN B12

INTRODUCCIÓN

La GAA es una enfermedad autoinmune órgano-específica que afecta la mucosa del cuerpo y fundus del estómago (gastritis tipo A). (Di Sabatino et al., 2015) La aparición de la GAA está marcada por la presencia de anticuerpos anti-células parietales (APCA) y anticuerpos anti- factor intrínseco (AFI) circulantes. El principal antígeno de los APCA es la bomba de protones gástrica H⁺/K⁺ adenosina-trifosfatasa (ATPasa) que desencadena la respuesta autoinmune y el progreso de la enfermedad por la destrucción consecutiva de las células parietales (CP) y la pérdida funcional de la mucosa gástrica oxíntica. El principal antígeno de los AFI es el factor intrínseco (FI), un cofactor indispensable para la absorción de la VitB12 a nivel del íleon. Al instaurarse la atrofia, la GAA puede progresar a su fase final más severa, la anemia perniciosa (AP). (Bergamaschi & Di Sabatino & Corazza, 2018)

La anemia megaloblástica que aparece en la fase final de la GAA se conoce como AP. Los criterios diagnósticos que definen a la AP, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), son: hemoglobina (Hb) <13 g/dL en hombres y <12 g/dL en mujeres, volumen corpuscular medio (VCM) ≥100 fL y VitB12 sérica <200 pg/mL, además de la presencia concomitante de GAA (cuyo criterio de diagnóstico es la evidencia histológica de atrofia gástrica) y el déficit de FI. (Sun et.al., 2016)

La anemia megaloblástica es la manifestación de un defecto en la síntesis del ADN, que compromete a todas las células del organismo con capacidad proliferativa, es decir, los precursores de las tres series hematopoyéticas, GR, glóbulos blancos (GB) y plaquetas (PLT), como así también células no hematopoyéticas con elevado recambio celular (piel, mucosas, epitelio gastrointestinal). La síntesis de ARN y de proteínas es normal, lo cual se refleja morfológicamente con el aumento de tamaño de precursores hematopoyéticos, asincronía madurativa núcleo-citoplasmática y eritropoyesis ineficaz con aborto intramedular. (Green & Datta, 2017)

Los posibles factores etiopatogénicos son comunes en ambas situaciones, por estos motivos se considera la GAA como un estadio latente o previo a la AP. Las consecuencias clínicas de GAA y AP sin diagnosticar y sin el tratamiento adecuado pueden ser de gran severidad, desde lesiones neurológicas irreversibles hasta neoplasias gástricas. Sin embargo, el diagnóstico de GAA y AP sigue siendo un desafío en muchas circunstancias para muchos médicos debido a sus diversas

manifestaciones clínicas, asociación con otras patologías y las limitaciones en las herramientas de diagnóstico actualmente disponibles.

El objetivo de esta revisión bibliográfica es realizar una descripción actualizada sobre las distintas presentaciones clínicas, bioquímicas y hematológicas que se puedan observar en pacientes con GAA y AP, para concientizar sobre la importancia de realizar un diagnóstico temprano y así evitar consecuencias clínicas irreversibles.

CAPÍTULO 1. DE LA MACROCITOSIS A LA ANEMIA MEGALOBLÁSTICA

1.1. MACROCITOSIS: ASPECTOS GENERALES

La macrocitosis es el aumento del tamaño de los GR, y se define como un aumento del VCM por encima de los 100 femtolitros (fL). El VCM es un índice hematimétrico que indica el tamaño promedio de los GR. Los valores de referencia del VCM de una población adulta se hallan entre 80 y 100 fL y varían según la edad. Se recomienda siempre informar el VCM con el valor de referencia asociado a la edad debido a que, generalmente, los valores de referencia en niños son menores, excepto durante el período neonatal donde suelen estar aumentados. (Green & Denis & Dwyre, 2015) Se ha observado que en pacientes añosos existe una aparente macrocitosis.

Una macrocitosis puede ser identificada mediante los índices eritrocitarios automatizados. Además, la observación de un frotis de sangre periférica (SP), coloreado con la tinción de May Grunwald- Giemsa, permite aproximar el tamaño de un GR, ya que un tamaño normal se asemeja al núcleo de un linfocito pequeño. (Merino, 2014-2015) (Figura 1)

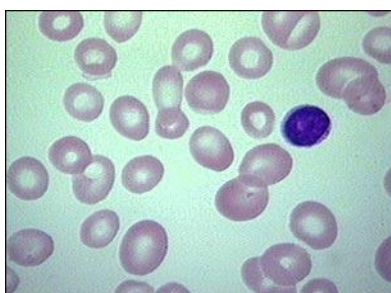


Figura 1. Imagen de glóbulos rojos de gran tamaño y un linfocito pequeño. (100x)

Existen interferentes relacionados a la muestra que pueden elevar falsamente el valor del VCM. La hiperglucemia, ya sea por una diabetes descompensada o por la extracción cercana a una vía de suero glucosado, donde los GR (expuestos a altas concentraciones de glucosa *in vivo*) entran en contacto con el diluyente isotónico del contador y se produce un desequilibrio osmótico (*in vitro*). Se estima que con concentraciones de glucosa mayores a 360 mg/dl se puede observar un aumento leve

del VCM. (Alamri et al., 2019) Un cuadro similar se puede observar en casos de hipernatremia o uremia severa. (Philipsen & Madsen, 2015) Otro interferente es la presencia de crioaglutininas, anticuerpos que se unen a antígenos presentes en la membrana eritrocitaria a una T° entre 0° a 4°, causando aglutinación de los eritrocitos entre sí en la microcirculación, lo que provoca que los dobletes o tripletes de GR que pasen por la abertura, se cuenten como única célula, lo que resultará en una falsa disminución del recuento de GR y falso aumento del VCM. (Tema et al., 2018) El almacenamiento prolongado de la muestra también puede producir aumentos falsos del VCM cuando es mayor a 8 horas a T° ambiente.

1.2. **SIGNIFICADO CLÍNICO**

La macrocitosis es un hallazgo frecuente, con una prevalencia de entre 1,7% a 3,6% de la población general adulta y su valor clínico suele estar subestimado por los especialistas médicos debido al alto porcentaje de pacientes que presentan macrocitosis sin anemia asociada. (Nucifora & Basack, 2015)

Por lo general, no hay complicaciones asociadas a una macrocitosis aislada, sin embargo, su identificación puede proveer información importante con respecto a la presencia de una enfermedad subyacente. (Lanier & Park & Callahan, 2018)

Existe una macrocitosis fisiológica sin anemia asociada, como es el caso de neonatos y embarazadas, que no requiere mayor investigación. En algunas familias varios miembros pueden tener macrocitosis sin otras anomalías y probablemente sean de causa genética. (Lanier & Park & Callahan, 2018) En pediatría se la considera fisiológica hasta las 8 semanas de vida. En una revisión de la etiología de macrocitosis en niños de 6 a 12 años, la primera causa fue relacionada a medicamentos. Otras causas menos frecuentes son las cardiopatías congénitas, síndrome de Down y las anemias hemolíticas. Los síndromes de falla medular y la anemia megaloblástica son de baja frecuencia. (Nucifora & Basack, 2015)

En niños y adultos con síndrome de Down se ha observado macrocitosis que aparece de forma independiente a la patología cardíaca, muy prevalente por otra parte en esta población. Su etiología y significado clínico resultan todavía inciertos. A

consecuencia de esta macrocitosis frecuente, la presencia de anemia ferropénica o talasemia, entre otras, pueden pasar desapercibidas. (Andres & Fernandez & Fernandez-delgado, 2012)

La anamnesis, la exploración física, el recuento reticulocitario y otros parámetros bioquímicos permiten determinar la causa de la macrocitosis.

1.3. **MACROCITOSIS CON ANEMIA ASOCIADA**

La anemia macrocítica describe un estado anémico, es decir una concentración de hemoglobina (Hb) por debajo de los valores de referencia en relación a la edad y sexo del paciente y presencia de macrocitos en SP ($VCM > 100$ fL). (Lanier & Park & Callahan, 2018)

Son numerosas las causas de las anemias macrocíticas, pero por lo general están subdivididas en: macrocitosis megaloblástica (asociado generalmente a trastornos madurativos de la hematopoyesis) y macrocitosis no-megaloblástica (cuando obedece a causas sin implicancia de un trastorno madurativo). (Moore & Adil, 2020) Ésta clasificación es importante y con frecuencia ayuda a determinar la etiología de la anemia. El estudio minucioso de la morfología de los GR en SP, como así también, la determinación de parámetros bioquímicos puede proveer información importante para determinar la causa subyacente de la misma.

1.3.1. **ANEMIAS MACROCÍTICAS NO-MEGALOBLÁSTICAS**

La macrocitosis puede estar asociada a la aceleración de la maduración eritroide o puede ser consecuencia de un estado de deficiencia relativa de ácido fólico (AF) inducido por el aceleramiento del ciclo celular. (Kujovich, 2016)

El estudio del frotis de SP no es útil para determinar las causas de las anemias macrocíticas no-megaloblásticas, a excepción de la existencia de policromatofilia, la cual indica la presencia de un aumento de GR inmaduros, que se identifican por su mayor tamaño y color grisáceo, sugestivo de un aumento del recuento de reticulocitos.

Al ser de mayor tamaño que los GR maduros, cuando hay reticulocitosis, se eleva el VCM. Por cada 1% de aumento del recuento de reticulocitos, se incrementa 1 fL el VCM. Un aumento en el recuento de reticulocitos es indicativo de un incremento de la actividad eritropoyética, por ende, una macrocitosis con policromatofilia y reticulocitosis podría estar presente en procesos hemolíticos o hemorrágicos, para lo cual, se deberían realizar pruebas bioquímicas como la determinación de bilirrubina y de lactato deshidrogenasa. (Piva et al., 2015)

Otra causa de anemia macrocítica no-megaloblástica es el abuso de alcohol, siendo ésta la causa más común de macrocitosis secundaria y, ante la interrupción de la ingesta, ésta condición por lo general revierte. El 90% de los pacientes con un consumo diario igual o superior a 80 gramos de alcohol, presentan un VCM de 100-110 fL. Esto puede ser debido a una nutrición deficiente por interferencia del alcohol en la absorción de la VitB12 y/o AF o como consecuencia de la hepatopatía. (Nagao & Hirokawa, 2017)

La hepatopatía, tanto de origen alcohólico como de cualquier otro, se asocia con macrocitosis, sobre todo si hay cirrosis, debido a que se produce un aumento de colesterol y fosfolípidos en la membrana eritrocitaria. (Takahashi & Kameoka & Takahashi, 2016)

El uso de ciertas drogas puede causar macrocitosis por deterioro de la disponibilidad o utilización celular del AF o VitB12. En la Tabla I se enumeran las drogas que inducen a macrocitosis. (Green & Datta, 2017)

El tratamiento con eritropoyetina recombinante (por ej. en enfermedad renal) puede desencadenar una macrocitosis presentando reticulocitosis, que en algunas ocasiones responde a la administración de AF; en éstas situaciones la deficiencia de AF puede estar relacionado a la pérdida del mismo durante la hemodiálisis. (Koury, 2014)

Tabla 1. Drogas que inducen macrocitosis (Nagao & Hirokawa, 2017)

Antineoplásicos	<p>Azatioprina</p> <p>Capecitabina</p> <p>Cladribina</p> <p>Ciclofosfamida</p> <p>Hidroxiurea</p> <p>Metotrexate</p> <p>Imatinib</p>
Antibacterianos	Sulfametoxazol-trimetoprima
Antimaláricos	Pirimetamina
Anticonvulsivantes	<p>Fenitoína</p> <p>Primidona</p> <p>Ácido Valproico</p>
Anti-inflamatorios	Sulfasalazina
Antivirales	<p>Estavudivina (d4t)</p> <p>Lamivudina</p> <p>Valaciclovir</p> <p>Zidovudina</p>
Antidiabéticos	Metformina
Diuréticos	Triamtereno

En algunas enfermedades hematológicas también se puede observar macrocitosis, como en la anemia aplásica y síndrome mielodisplásico, siendo éste último la causa más común de anemia macrocítica asociado a estas enfermedades. (Nagao & Hirokawa, 2017; Koury, 2014)

El hipotiroidismo también está asociado a la presencia de anemia macrocítica, ya que la hormona triiodotironina es necesaria para la reducción del tamaño del eritroblasto durante el estadio de diferenciación terminal de la eritropoyesis, por lo

tanto su deficiencia podría producir macrocitosis. (Lanier & Park & Callahan, 2018; Nagao & Hirokawa, 2017)

1.3.2. ANEMIAS MACROCÍTICAS MEGALOBLÁSTICAS

La anemia megaloblástica es la manifestación de un defecto en la síntesis del ADN, que compromete a todas las células del organismo con capacidad proliferativa, es decir, los precursores de las tres series hematopoyéticas, GR, glóbulos blancos (GB) y plaquetas (PLT), como así también células no hematopoyéticas con elevado recambio celular (piel, mucosas, epitelio gastrointestinal). La síntesis de ARN y de proteínas es normal, lo cual se refleja morfológicamente con el aumento de tamaño de precursores hematopoyéticos, asincronía madurativa núcleo-citoplasmática y eritropoyesis ineficaz con aborto intramedular. Se observa, por lo tanto, megalocitos con VCM por encima de 120 fL, anemia por disminución de la concentración de Hb, un acortamiento de la vida media eritrocitaria y aumento de la hemoglobina corpuscular media (HCM). (Green & Datta, 2017)

La alteración de la síntesis de ADN se debe en un 95% de los casos a la deficiencia de los factores vitamínicos necesarios para su síntesis: VitB12 y AF.

Otra causa menos frecuente son los fármacos citotóxicos (antineoplásicos o inmunosupresores). Por lo tanto, la identificación de la causa es fundamental para realizar el diagnóstico precoz y el tratamiento adecuado, pues ambos factores determinan un pronóstico más favorable. (Hariz & Bhattacharya, 2020)

1.3.2.1. DEFICIT DE AF

El AF o ácido pteroilglutámico es una vitamina hidrosoluble del complejo B sintetizadas por las bacterias de la flora intestinal y aportada en pequeñas cantidades por los alimentos (frutas, verduras, lácteos, cereales, algunas vísceras animales). Se absorbe fundamentalmente en el yeyuno y es convertido en poliglutamato, lo que garantiza su permanencia en el interior de las células del organismo, al ser

impermeable a la membrana. Las necesidades diarias mínimas son normalmente de 50-100 μg , pudiendo aumentar en determinadas situaciones fisiológicas, como en el embarazo o la lactancia hasta los 500 y 300 $\mu\text{g}/\text{día}$ respectivamente. La reserva de AF es escasa por lo que la deficiencia tarda aproximadamente 4 meses en desarrollarse cuando hay carencia en el aporte. (Nagao & Hirokawa, 2017; Green & Datta, 2017)

La causa más frecuente de este tipo de anemia megaloblástica es por ingesta deficiente, especialmente en alcohólicos y ancianos, pero también se ven afectadas todas aquellas personas que presentan un aumento de las necesidades por causas fisiológicas (embarazo, lactancia, infancia y adolescencia) o por causas patológicas, como los estados de hemólisis crónica, personas con trastornos alimentarios, pacientes tratados por infección con VIH, pacientes con determinadas enfermedades hematológicas o pacientes tratados con antagonistas del AF, como por ejemplo el metotrexato (MTX). (Koury, 2014)

El MTX es un análogo del AF que inhibe la enzima dihidrofolato reductasa necesaria para la conversión del AF en su forma reducida, el tetrahidrofolato (THF), es decir que impide la síntesis de ADN, ARN y proteínas, por ende se inhibe la proliferación celular, acción que explica su efecto antineoplásico. Teniendo en cuenta que el principal mecanismo de toxicidad del MTX es la depleción de AF, basado en su mecanismo de acción como antifolato, uno de los pilares básicos para un correcto uso del MTX va a ser la administración conjunta con folatos. El ácido folínico, indicado para el tratamiento de los efectos tóxicos del MTX, es la forma reducida del AF que en el organismo se transforma rápidamente en THF, de esta manera el ácido folínico interviene en las reacciones intracelulares que utilizan folatos, sin que para ello sea necesaria la acción de la enzima dihidrofolato reductasa. El ácido folínico delimita la acción inhibitoria del MTX sobre las células normales, compitiendo por el mismo mecanismo de transporte hacia el interior de las células. Administrado en el momento adecuado, “rescata” las células normales de los efectos tóxicos de dosis altas de MTX (Ortega & Escudero & Calvo, 2013)

Como se mencionó anteriormente, el AF no posee actividad coenzimática, pero sí su forma reducida, el THF. Éste lleva a cabo funciones esenciales como la aceptación y donación de unidades monocarbonadas unidas a determinados niveles

del anillo pteridina, dando lugar así a la síntesis de purinas y pirimidinas. Además, resulta imprescindible en el ciclo de metilación de los aminoácidos, un paso fundamental en la reconversión de homocisteína (Hcy) en metionina (Met). Su principal manifestación es la aparición de anemia, aunque también se produce una reducción de la actividad del ciclo de metilación, lo que dará lugar a la aparición de patologías neuronales asociadas a una deficiente biosíntesis de mielina. Por otro lado, niveles bajos de AF da lugar a la acumulación de Hcy plasmática, descrita como un posible factor de riesgo en patologías cardiovasculares. (Sobczyńska-malefora & Harrington, 2018)

1.3.2.2 DÉFICIT DE VITB12

La deficiencia de VitB12 se considera un problema de salud pública a nivel mundial. Se estima que entre un 15-25% de la población en países como Estados Unidos y Alemania, tienen deficiencia de VitB12 y en países como India, aproximadamente un 75% de la población,

es decir, más de 650 millones de personas tienen déficit de VitB12, lo cual puede ser atribuido, en parte, a una dieta vegetariana en una proporción sustancial de esta población. (Hunt & Harrington & Robinson, 2014)

El déficit de VitB12 es una condición multifactorial causada por una deficiencia nutricional, como así también, defectos hereditarios o adquiridos que interrumpen la correcta absorción, metabolismo o vía de transporte (deficiencia funcional). La VitB12 desempeña un papel clave en la síntesis de ADN y en la maduración celular, así como en la síntesis de lípidos neuronales. Es un micronutriente soluble esencial requerido por todas las células. Aunque la VitB12 es sintetizada activamente por un gran número de bacterias intestinales que se hallan de modo habitual en el organismo humano, el aprovechamiento de ésta es mínima, ya que la síntesis ocurre en sitios muy distales del lugar de absorción fisiológica de la vitamina, lo que determina que casi en su totalidad sea eliminada por las heces. Como producto de esto, la VitB12 debe ser necesariamente aportada por los alimentos, cuya mayor fuente dietética se encuentra en las proteínas animales (carnes, leche y derivados, huevos, pescados). Es por esto

que en veganos o lacto-ovo vegetarianos es importante la suplementación con VitB12 para cubrir los requerimientos diarios.

En general, la VitB12 no se destruye por cocción, pero en condiciones alcalinas y en presencia de vitamina C puede perderse cierta cantidad cuando ésta se realiza a altas temperaturas. (Hannibal & Lysne & Bjørke-Monsen, 2016)

1.3.2.3 ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LA VITB12

La VitB12 es una cobalamina (PM 1,355 g/mol) que resulta de la unión asimétrica de 4 anillos pirrólicos formando un grupo macrocíclico casi planar (núcleo corrina) en torno a un átomo central de cobalto (Co). El estado de oxidación del Co condiciona el funcionamiento de la VitB12. Sobre el Co se producirán cambios óxido-reductores enzimáticamente controlados que llevarán al Co desde la carga +3 (forma circulante de la vitamina) a su estado más reducido Co^+ (forma intracelular). El estado Co^{+2} resulta inadecuado para las uniones iónicas con el grupo ciano (-CN) o hidroxilo (-OH) (que sólo se unen a Co^{+3}) o para las uniones covalentes con metilos o adenosinas (que sólo se unirán a Co^+). Además, existen diversos análogos sin actividad vitamínica: corrinoídes (cobalaminas en las que no existe el nucleótido, está reemplazado por otro, o se ha sustituido el Co por otro metal). En la estructura de la VitB12, el Co posee 6 valencias de coordinación, 4 de las cuales establecen enlace covalente con los correspondientes nitrógenos de los anillos pirrólicos. La quinta valencia de coordinación se halla siempre unida a un pseudonucleótido complejo, el 5,6 dimetilbencimidazol y la sexta valencia al unirse a diferentes radicales origina los diversos derivados de la cobalamina, La hidroxicobalamina (OH-Cbl) y la cianocobalamina (CN-Cbl) son formas no fisiológicas de la VitB12 que en el organismo se transforman espontáneamente en metilcobalamina y 5'-desoxiadenosilcobalamina (AdoCbl), las formas fisiológicamente activas o coenzimas de la VitB12. La CN-Cbl por exposición a la luz y a los agentes reductores pasa rápidamente a la forma de OH-Cbl. (Smith & Warren & Refsum, 2018) (Figura 2)

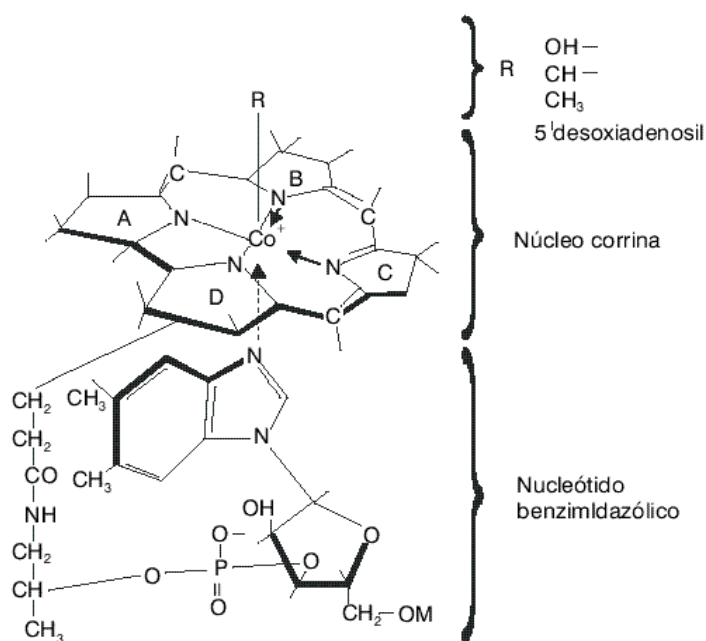


Figura 2. Estructura química de la Vitamina B12. (Smith & Warren & Refsum, 2018)

El tracto gastrointestinal humano está provisto de un complejo sistema para la absorción eficiente de las mínimas cantidades de VitB12 de la dieta. Durante la ingesta de alimentos, en el tracto gastrointestinal superior, la VitB12 es captada por la haptocorrina o Proteína R (HC) la cual tiene alta afinidad por la VitB12 y sus análogos y protege a la vitamina de la hidrólisis por el entorno ácido del estómago. La VitB12 permanece unida hasta la escisión proteolítica del complejo en el duodeno donde luego se une al factor intrínseco (FI), una segunda proteína transportadora, sintetizada por las células parietales (CP) de la mucosa gástrica. El FI, en contraste con la HC, tiene gran afinidad por la VitB12 y muy poca afinidad por sus análogos y es necesario para la captación de VitB12 en el íleon terminal. Al atravesar la membrana intestinal, el complejo se une a la superficie apical de las células endoteliales y se internaliza por endocitosis mediada por un receptor formado por el macrocomplejo Cubilina-AMN o complejo CUBAM. El complejo CUBAM consta de dos moléculas colaboradoras: la Cubilina (que es una proteína de membrana periférica que se une al complejo FI-B12), y la estructura denominada amnionless (AMN), que es una proteína transmembrana con actividad endocítica. La Cubilina (460 kDa) y el AMN (48 kDa) se coexpresan en la membrana apical de los epitelios de absorción tales como el íleon, los túbulos proximales del riñón, y el saco vitelino visceral.

En el interior del enterocito ileal, el FI se degrada y la VitB12 se transfiere por acción de la proteína resistente a multidrogas (MRP1, de las siglas en inglés), desde el lado basolateral de la célula hacia la circulación. Una vez producido el transporte desde el enterocito hacia el plasma, del 10-30% de la VitB12 circulará en el torrente sanguíneo unida a la Transcobalamina II (TC-II). El receptor del complejo TCII-VitB12 (CD320) se encuentra presente en las membranas de la mayoría de las células que requieren VitB12, principalmente los hepatocitos. El remanente de la vitamina (70-90%) se unirá a las cobalofilinas (TC I y TCIII) las cuales fijan la VitB12 pero no la transportan. (Smith & Warren & Refsum, 2018; Lazarowski, 2015) (Figura3).

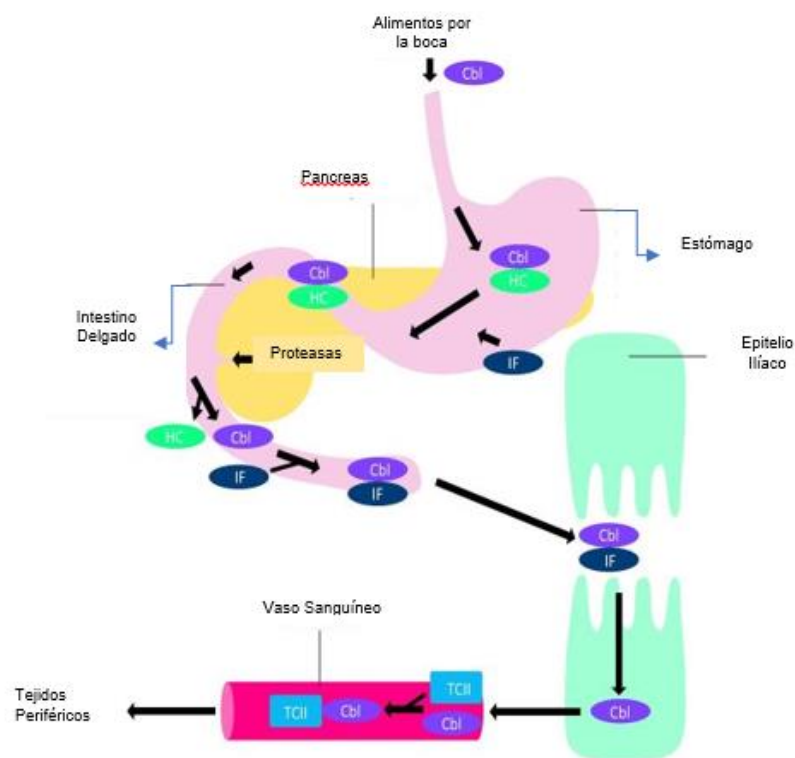


Figura 3. Absorción de la Vitamina B12. (Shipton & Thachil, 2015) *Cbl*: Cobalamina; *HC*: Haptocorrina; *IF*: Factor Intrínseco; *TCII*: Transcobalamina II

Los derivados biológicamente activos de la VitB12 actúan como cofactores en diferentes y complejas reacciones enzimáticas. La metilcobalamina es una coenzima necesaria para que la enzima metionina sintetasa (metiltransferasa) transfiera un grupo metilo desde el N5-metil-tetrahidrofolato (metil-THF) hacia la Hcy. De esta

manera, se genera el THF (por pérdida de un grupo metilo del metil-THF), la cual es la forma activa del AF, y la Met (por la adición de un grupo metilo a la Hcy). Cuando hay déficit de VitB12, es decir de metilcobalamina, se interrumpe la conversión de Hcy a Met (hay acumulación de Hcy) y el metil-THF no puede ser convertido a THF. El folato comienza a ser “atrapado” en la forma de metil-THF y se desarrolla una deficiencia de metilén-THF, cofactor fundamental que interviene en la síntesis de la timina siendo la coenzima de la timidilato sintetasa (TS) que transforma la desoxiuridina monofosfato en desoxitimidina monofosfato, esencial para la síntesis del ADN. Existe, por lo tanto, un freno proliferativo que afectará principalmente al tejido hematopoyético. Se produce una inhibición en la síntesis de timina con acumulación de uridina y por ende, una copia de ADN con una secuencia aberrante. Se observa hiperproliferación medular, cambios megaloblásticos y una eritropoyesis ineficaz. (Shipton & Thachil, 2015)

Por otro lado, la Met es un precursor de la S adenosil metionina (SAM) que es necesario para ciertas reacciones de transmetilación en las que se incluye algunas que pueden ser esenciales para el mantenimiento de la mielina. La concentración de SAM es regulada por retroalimentación negativa; la SAM inhibe la conversión de metilén-THF a metil-THF, que es la coenzima del folato que dona el grupo metilo a la Hcy para formar Met. Cuando la concentración de SAM disminuye como consecuencia de la disminución de Met, la conversión de metilén-THF a metil-THF se acelera y la Hcy es desviada a Met, manteniendo las concentraciones de SAM. En la deficiencia de VitB12 ocurre una respuesta semejante, pero en este caso el metil-THF no puede ser utilizado, y no sólo es atrapado, sino que también es sintetizado de forma acelerada. (Trampa de folatos). (Figura 4) (Stabler, 2013)

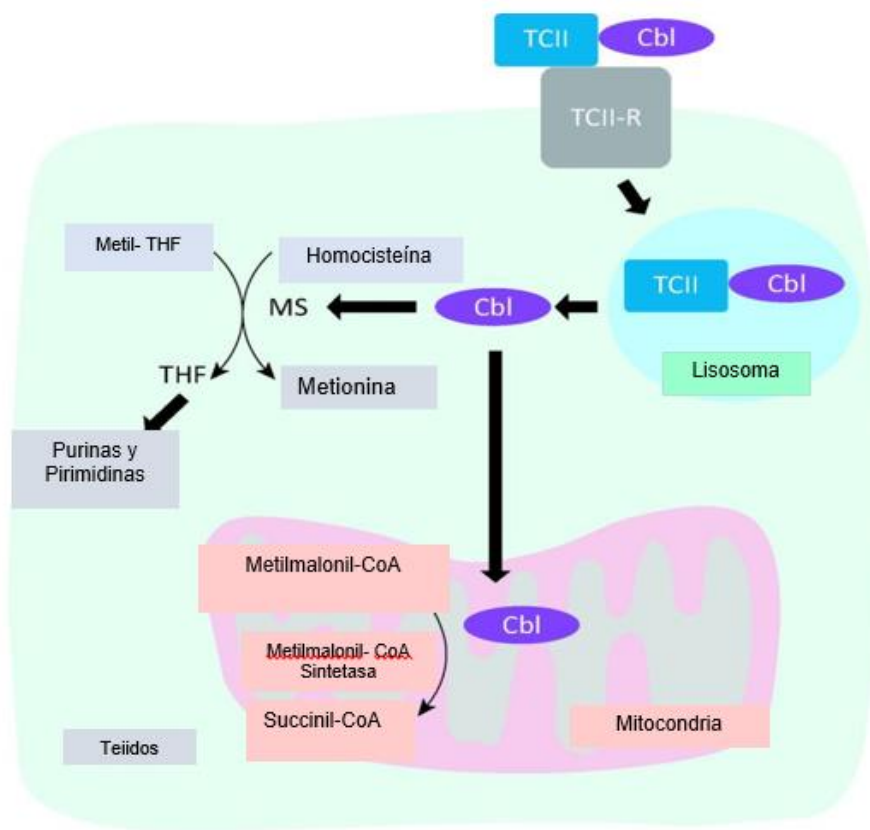


Figura 4. Metabolismo de la Vitamina B12. (Stabler, 2013) Cbl: Cobalamina; TCII: Transcobalamina II; TCII-R: Receptor de Transcobalamina II; MS: Metil transferasa; THF: Tetrahidrofolato.

La otra coenzima es la 5´desoxiadenosilcobalamina, la cual es requerida para la conversión de metilmalonil-CoA a succinil-CoA en la mitocondria, reacción catalizada por la enzima mitocondrial metilmalonil-CoA sintetasa. Esta reacción es de gran importancia en la reutilización mitocondrial del propionil-CoA, procedente de la oxidación de ácidos grasos de cadena impar, para la obtención de energía en forma de ATP a través del ciclo de Krebs. Su déficit produce acidosis metabólica con elevación del ácido metilmalónico (AMM) en sangre y orina, como así también de ácido propiónico y se sintetizan ácidos grasos no fisiológicos, que se incorporan a los lípidos neuronales que contribuyen a las complicaciones neurológicas. (Figura 4.) (Aparicio & Palacios & Alder, 2015)

Por lo tanto, las principales consecuencias observadas en pacientes con deficiencia de VitB12 son la anemia megaloblástica y los defectos desmielinizantes en el sistema nervioso central.

Los requerimientos mínimo diarios de VitB12 oscilan entre 2 – 5 µg, sin variaciones respecto a la edad y el sexo. La mayor parte de la VitB12 de las células y el hígado se encuentra en las mitocondrias en forma de AdoCbl, mientras que la metilcobalamina es la principal forma de VitB12 en el plasma, aunque pequeñas cantidades de esta coenzima se pueden encontrar en las células. El requerimiento mínimo es la cantidad de vitamina necesaria para cubrir las pérdidas diarias de ésta, que se producen fundamentalmente por la orina, las heces y las descamaciones cutáneas, que corresponden al 0,1 %/día (1,3 µg). En el hombre, las reservas totales de VitB12 (2-5 mg, aproximadamente 1 mg en el hígado) son mucho mayores que los requerimientos diarios. Se estima que las reservas corporales y la circulación entero-hepática generan un importante ahorro de la vitamina, y son suficientes para cubrir los requerimientos diarios luego de un período de 3 a 4 años con déficit en el aporte vitamínico. (Salinas et al., 2015)

Existen múltiples causas de deficiencia de VitB12, ya que el fallo de cualquiera de los pasos del complejo proceso de asimilación que sufre la VitB12 desde los alimentos hasta su utilización a nivel celular, ocasiona la interrupción de éste y por lo tanto, la posibilidad potencial de desarrollar una deficiencia de ésta vitamina. Algunas de las causas de deficiencia de VitB12 se enumeran en la Tabla II.

Tabla 2. Causas de deficiencia de VitB12. (Shipton & Thachil, 2015)

Insuficiencia dietética	Vegetarianos estrictos, veganos, lactantes de madres vegetarianas, alcoholismo crónico, ancianos.
Malabsorción	Enfermedad de Crohn, Enfermedad Celíaca, resección ileal, insuficiencia pancreática
Ginecológico/Obstétrico	Anticonceptivos orales, terapia de remplazo hormonal, embarazo
Desórdenes del transporte plasmático	Déficit congénito de transcobalamina II, déficit de Proteína R
Medicamentos	Omeprazol, metformina, neomicina
Desórdenes gástricos	Gastrectomía parcial o total, Gastritis atrófica autoinmune, Anemia Perniciosa

La causa más común de deficiencia de VitB12 dentro de los desórdenes gástricos es una enfermedad definida cuya patogénesis es la malabsorción resultante de la pérdida de la secreción de FI en el estómago. Esta enfermedad es la GAA, que será descrita a continuación, y cuya fase final es la AP, donde existe severa atrofia gástrica con aclorhidria y secreción disminuida o ausente de FI, producto de la atrofia de la mucosa. Estos pacientes presentan además fenómenos inmunológicos como la presencia de anticuerpos anti-células parietales (APCA) y anti-FI (AFI). (Aparicio & Palacios & Alder, 2015; Salinas et al., 2015)

CAPÍTULO 2. UN COMIENZO SILENCIOSO: GASTRITIS ATRÓFICA AUTOINMUNE

2.1. ASPECTOS GENERALES

La GAA es una enfermedad autoinmune órgano-específica que afecta la mucosa del cuerpo y fundus del estómago (gastritis tipo A) que difiere etiológica e histológicamente de la gastritis del antro (tipo B) asociada a *Helicobacter pylori* (Hp). (Di Sabatino et al., 2015)

La aparición de la GAA está caracterizada por la presencia de anticuerpos anti-células parietales (APCA) y anticuerpos anti- factor intrínseco (AFI) circulantes. El principal antígeno de los APCA es la bomba de protones gástrica H⁺/K⁺ adenosina-trifosfatasa (ATPasa) que desencadena la respuesta autoinmune y el progreso de la enfermedad por la destrucción consecutiva de las células parietales (CP) y la pérdida funcional de la mucosa gástrica oxíntica. El principal antígeno de los AFI es el FI, un cofactor indispensable para la absorción de la VitB12 a nivel del íleon. Al instaurarse la atrofia y/o displasia, la GAA puede progresar a su fase final más severa, la AP. (Bergamaschi & Di Sabatino & Corazza, 2018)

Las CP son células epiteliales localizadas en las glándulas de la mucosa gástrica cuya función es secretar ácido clorhídrico (HCl) a través de la bomba H⁺/K⁺ ATPasa y FI. La H⁺/K⁺ ATPasa es una proteína de membrana, está formada por una subunidad catalítica α de 100 kDa y una subunidad β de 60–90 kDa. La subunidad catalítica α conservada está fosforilada durante sus ciclos de reacción y la subunidad β comprende un núcleo proteico de 35 kDa fuertemente glucosilado. Esta proteína recubre los canalículos secretores de las CP y es responsable de la secreción de iones hidrógeno a cambio de iones potasio.

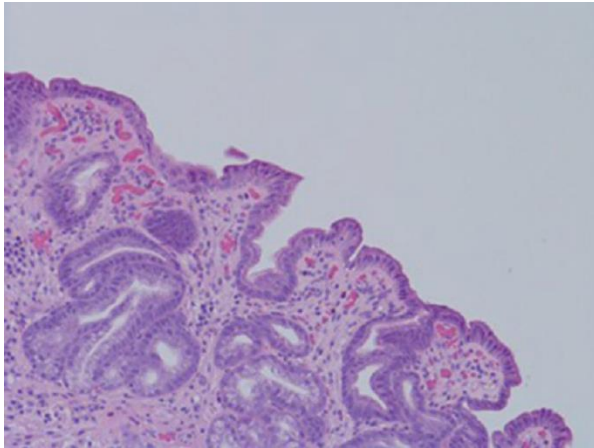
Se asume como factor desencadenante que, durante el recambio epitelial, una cierta cantidad de proteína H⁺/K⁺ ATPasa se vuelve accesible para las células dendríticas en la mucosa gástrica. Cuando se presenta como antígeno a las células T naive, puede surgir un clon patogénico de células Th1 CD4⁺CD25⁻ específicas de antígeno en individuos predispuestos que infiltran la mucosa gástrica, lámina propia y

glándulas gástricas, junto con macrófagos y linfocitos B. La inflamación crónica resultante lleva a la atrofia de la mucosa, con disminución y finalmente pérdida total de CP y por consiguiente, hipoclorhidria severa o aclorhidria con pérdida de FI. (Bergamaschi & Di Sabatino & Corazza, 2018)

La GAA es causada por acción de las células T CD4+ autorreactivas que reconocen H⁺/K⁺ ATPasa, y conducen a su destrucción. La subunidad β se considera el antígeno causal y fuente de respuesta autoinmune responsable del daño a la mucosa gástrica. Las APCA están presentes en alta frecuencia en AP (80–90%), especialmente en etapas tempranas de la enfermedad y se unen tanto a las subunidades α y β de H⁺/K⁺ ATPasa gástrica. En las etapas posteriores de la enfermedad, las CP disminuyen debido a la progresión de la gastritis autoinmune, lo que resulta en disminución de la tasa antigénica. Los estudios han reportado positividad IFA en 40-60% de pacientes con AP. (Varbanova & Frauenschlager & Malfertheiner, 2014)

Hay evidencia que existen mecanismos de mimetismo molecular que señalan al Hp como disparador de GAA. Hp es un patógeno gástrico común que afecta a casi la mitad de la población mundial y se asocia con gastritis antral tipo B. El mimetismo molecular entre antígenos de Hp y H⁺/K⁺ ATPasa gástrica se ha invocado como un mecanismo para la génesis de la gastritis autoinmune. La hipótesis (Toh, 2014) se basa en la observación de que los pacientes infectados por Hp con GAA albergan células T CD4 + gástricas que reconocen epítopes compartidos entre H⁺/K⁺ ATPasa gástrico y Hp. La reacción cruzada produce proliferación de linfocitos T y producción de citocinas Th1 y se han identificado autoanticuerpos hacia H⁺/K⁺ ATPasa en el 20-30% de los pacientes infectados por Hp. Si bien estos estudios sugieren un vínculo causal no proporcionan evidencia definitiva. (Toh, 2014)

a)



b)

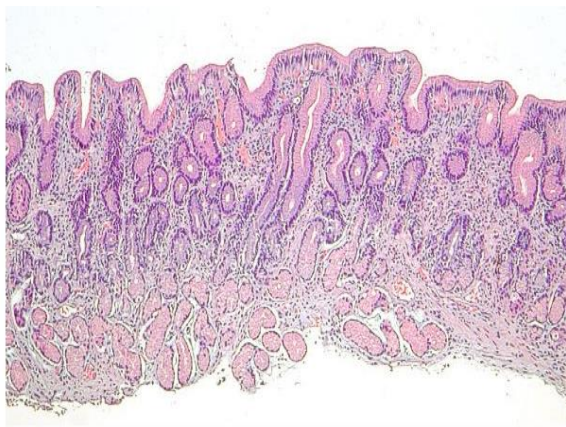


Figura 5. a) Biopsia gástrica mostrando infiltración linfocítica. (Minalyan et.al., 2017) b) Biopsia gástrica normal. (Sanz Anquela et. al., 2005)

El daño ocasionado en la mucosa del cuerpo y fundus resulta en la ausencia o disminución de la secreción de HCl, de pepsinógeno (PG) y FI; elevación de la gastrina sérica (GAS) por estimulación de células G y presencia en suero y jugo gástrico de auto-anticuerpos gástricos. Además, el incremento de la producción de GAS estimula las células enterocromafines (ECL) causando hiperplasia de las mismas, y esta hiperplasia puede finalmente resultar en la formación de carcinoides gástricos. (Minalyan et.al., 2017)

En Estados Unidos, la GAA tiene una prevalencia del 2%, con un incremento dependiente de la edad. La incidencia anual de GAA es de 25 casos nuevos/100,000 personas con una mayor frecuencia en pacientes con otras enfermedades autoinmunes, en particular diabetes mellitus y tiroiditis autoinmune. GAA es más

común en mujeres (F: M razón de 3:1) y en individuos mayores a 60 años, aunque recientemente se ha observado un incremento en la incidencia en la población de edades comprendidas entre 35 y 45 años. (Massironi et.al., 2019)

2.2. **GAA Y DEFICIENCIA DE HIERRO**

El contenido total de hierro (Fe) en un adulto sano es de 3-5 g. Dos tercios del total se encuentra formando parte de la Hb, la mayor parte del remanente es depositada en los tejidos como Fe de depósito (ferritina y hemosiderina) y solo escasos miligramos circulan activamente unida a la transferrina (Tf). (Lopez et.al., 2016)

Del total del Fe que se moviliza diariamente, sólo se pierde una pequeña proporción a través de la descamación de las células epidérmicas y células epiteliales del tracto gastrointestinal. La reposición de esta pequeña pérdida se realiza a través de la ingesta, a pesar de que la proporción de Fe que se absorbe de los alimentos es muy baja, entre 1-2 mg (aproximadamente el 10% de la ingesta total). Esta proporción varía de acuerdo a la cantidad y el tipo de Fe presente en los alimentos, el estado de los depósitos corporales, la actividad eritropoyética, y otros factores que interfieren o facilitan la absorción. (Lopez et.al., 2016; Deloughery, 2017)

La absorción depende en primer lugar del tipo de Fe presente en la dieta, en la cual van a existir dos formas diferentes: el Fe hemínico, presente en carnes rojas y blancas y el Fe no hemínico, en los alimentos de origen vegetal, sales minerales y algunos alimentos de origen animal como la leche y los huevos. (Massironi, 2019) La absorción del Fe hemínico es captada directamente a través de un hemo-receptor al interior del enterocito, donde luego es liberado. Intracelularmente, la hemoxigenasa-1 libera el Fe del hemo. La captación del Fe no-hemínico es más complejo y representa alrededor de un 80% del Fe total de la ingesta. El Fe inorgánico presente en todos los alimentos está en estado férrico (Fe^{+3}) y debe ser reducido a su estado ferroso (Fe^{+2}) para poder ser transportado al enterocito a través del transportador de metales divalentes 1 (DMT1). Esta reducción es llevada a cabo por la enzima citocromo b duodenal. Dentro del enterocito, el Fe^{+2} se almacena como ferritina. La liberación de Fe a la corriente sanguínea requiere del exportador de Fe, la ferroportina 1 (FPN1)

que está regulado por la hepcidina y por las proteínas reguladoras de Fe (IRP). La hefastina, una oxidasa multicobre homóloga a la ceruloplasmina, es necesaria para incorporar Fe^{+3} en la proteína plasmática Tf. La Tf circula en la sangre y proporciona Fe a la mayoría de las células del cuerpo. Además, el Fe unido a la Tf (Tf-Fe) es un importante indicador y determinante de la homeostasis sistémica del Fe. La saturación de Fe en la Tf está determinada predominantemente por la cantidad de Fe: (1) absorbido desde el intestino; (2) reciclados a partir de glóbulos rojos senescentes y liberados por macrófagos; y (3) utilizado para la eritropoyesis. (Figura 6) (Camaschella, 2019; Fuqua & Vulpe & Anderson, 2012; Steinbicker & Muckenthaler, 2013)

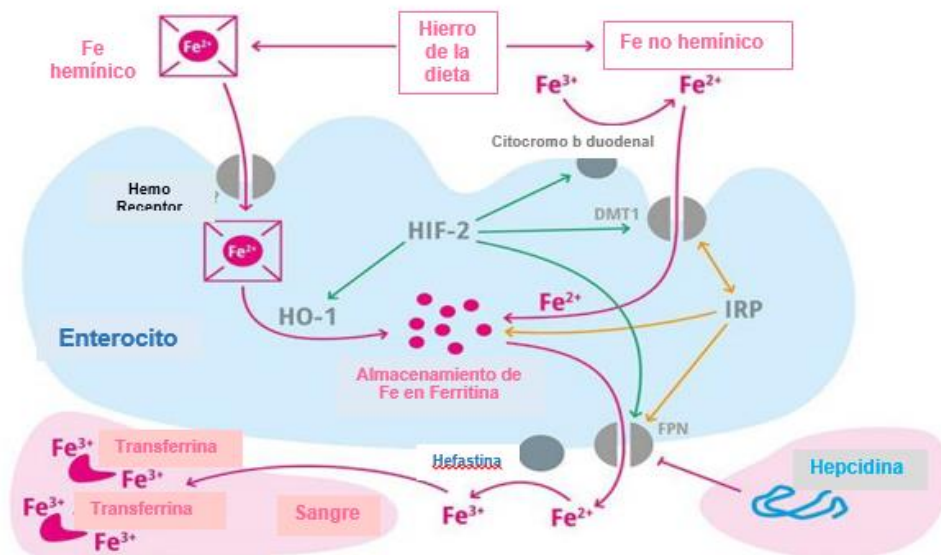


Figura 6. Absorción del Hierro (Steinbicker & Muckenthaler, 2013)

Existen varios factores que reducen el Fe^{+3} a Fe^{+2} para ser absorbido en el enterocito, además del citocromo b duodenal. Uno de ellos es el jugo gástrico (HCl). El jugo gástrico juega un rol importante en la absorción del Fe ya que lo mantiene en su estado reducido para su correcta absorción intestinal. En presencia de GAA, con la progresiva destrucción de CP, hay disminución severa e incluso ausencia de HCl. (Betesh et.al. 2015)

En la GAA, en general no se considera la posibilidad de que la hipo/aclorhidria se presente secundaria a la atrofia de la mucosa gástrica y que pueda estar asociado a deficiencia de Fe. (Betesh et.al. 2015) En la mayoría de los casos, la anemia por deficiencia de hierro (ADH) se asume como resultado de una pérdida de sangre del tracto gastrointestinal. Además, la posibilidad de que una ADH pueda ser causa de malabsorción sólo se sospecha en enfermedad celíaca (EC) y en casos de gastrectomía parcial, sin tener en consideración a enfermedades como GAA y AP. (Betesh et.al. 2015; Cavalcoli & Conte & Massironi, 2017)

La ADH fue la presentación más común para 32 pacientes con EC en un estudio retrospectivo observacional realizado por Jones et al. (Atallah Baydoun et.al., 2012) Los hallazgos de laboratorio comunes en los pacientes con ADH incluyeron: VCM por debajo de 80 fl, Fe sérico bajo y ferritina sérica baja. La ADH suele ser secundaria a malabsorción de Fe y a posible sangrado gastrointestinal, que se correlacionaría con la severidad de la atrofia de las microvellosidades. Además, el rasgo característico de la ADH asociada a la EC es su refractariedad al tratamiento con Fe oral.

El déficit de Fe que se desarrolla por la hipo/aclorhidria en la GAA, también es refractaria al tratamiento y puede preceder al desarrollo de la AP o puede presentarse conjuntamente con ella, es decir que, el VCM de estos pacientes puede estar aumentado, normal y hasta disminuido ya que un proceso puede enmascarar al otro. Entonces, ante una deficiencia de Fe sin sangrado gastrointestinal y refractaria al tratamiento, se debería no solo solicitar el perfil celíaco para descartar EC, sino también pruebas asociadas a GAA y AP.

En una revisión realizada por Toh BH (2014) se menciona que los pacientes con deficiencia de Fe inexplicable deben ser investigados para detectar GAA y AP, ya que la GAA se encuentra en el 20-27% de los pacientes con anemia ferropénica refractaria y es de 4 a 6 veces más común que la deficiencia de Fe refractaria presente en la EC. Estas características clínicas de la ADH asociada con la aclorhidria y la atrofia de la mucosa gástrica fueron descritas con precisión como la "anemia de la achylia gástrica" por Faber y otros hace más de 100 años. (Toh, 2014)

2.3. **GAA Y ASOCIACIÓN CON OTRAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES**

Los pacientes con GAA tienen 3-5 veces más riesgo de desarrollar enfermedades autoinmunes (tiroiditis autoinmune, diabetes mellitus tipo 1, vitíligo, enfermedad de Addison y miastenia gravis) que la población general. (Minalyan et.al., 2017) La asociación más frecuente es con la tiroiditis autoinmune. La asociación entre GAA y desordenes tiroideos se ha observado desde principios de 1960. La expresión “síndrome tirogástrico” fue formulado para indicar la presencia de tiroiditis autoinmune en pacientes con GAA o AP. Se cree que estos trastornos tienen una susceptibilidad genética común asociada con el antígeno leucocitario humano (HLA). Se reconoció (Lahner et.al., 2019) que los patrones específicos de HLA-DR (HLA-DRB1 * 03 y HLA-DRB1 * 04) eran más frecuentes en pacientes con GAA y AP que en pacientes controles. El mecanismo que conduce a la muerte celular tiroidea y/o parietal todavía no está bien definido. En GAA, las células parietales parecen expresar Fas, lo que desencadena la apoptosis al unirse al Fas-ligando presente en las células T infiltrantes. También se mostró una regulación positiva de Fas en los tirocitos. El proceso autoinmune es sostenido por la polarización de los linfocitos Th1 y su bucle de amplificación típico caracterizado por TNF-alfa e IFN- γ , que induce a la apoptosis de las células tiroideas. Cuando se produce el daño celular, se exponen epítopes específicos de tejido que conducen a la producción de autoanticuerpos (antitiroperoxidasa, antitiroglobulina, APCA, AFI) que caracterizan tanto la tiroiditis autoinmune como la gastritis.

La GAA fue reportada en 24%-35% de los pacientes con enfermedades tiroideas autoinmunes, especialmente tiroiditis de Hashimoto con una mayor prevalencia (hasta 45%) en pacientes de mayor edad. En un estudio realizado por Lahner et.al. (2019) se observó que los factores de riesgo para desarrollar tiroiditis autoinmune en 319 pacientes con GAA fueron: sexo femenino, presencia de APCA y atrofia metaplásica.

En pacientes con diabetes mellitus, se ha observado que 6-10% de los pacientes insulino-dependientes presentan GAA concomitante. (Kahaly & Hansen, 2016) En una revisión realizada por Minalyan et.al. (2017) utilizando modelos murino, se menciona que fue posible descubrir los genes de susceptibilidad de GAA (Gasa 1,

2,3 y 4) en los cromosomas 4 y 6 y en la región H2. Coincidentemente, tres de estos genes están localizados en el mismo locus que los genes de susceptibilidad de diabetes mellitus en ratones diabéticos no obesos, lo cual podría explicar la fuerte asociación que existe entre estas dos enfermedades. Estas observaciones sugieren que, en los pacientes que presenten estas enfermedades autoinmunes, se incluya además estudios para GAA y AP.

2.4. **MANIFESTACIONES CLÍNICAS**

La GAA puede ser asintomática o caracterizada por la presencia de síntomas gastrointestinales no específicos. Sin embargo, en algunos casos, se pueden observar manifestaciones hematológicas, neuro-psiquiátricas y gastroenterológicas. Los hallazgos iniciales más comunes fueron hematológicos (37%), siendo los de mayor frecuencia, la anemia megaloblástica, macrocitosis sin anemia y ADH, seguidos de una histología positiva para gastritis (34%), mientras que en <10% de los casos, la sospecha clínica de GAA se determinó por la presencia concomitante de otras enfermedades autoinmunes, síntomas neurológicos o antecedentes familiares positivos. (Massironi, 2019)

Los síntomas asociados a la anemia, ya sea ferropénica y/o megaloblástica (en la etapa más avanzada) que pueden presentar estos pacientes son debilidad, astenia, dolor de cabeza y síntomas cardíacos, sobre todo en pacientes añosos como palpitaciones y dolores de pecho. (Betesh et.al., 2015; Kulnigg-Dabsch, 2016)

En cuanto a las manifestaciones gastrointestinales, según un estudio de cohorte realizado por Carabotti et.al. (Massironi, 2019) que incluyó 379 pacientes con GAA, se demostró que más de la mitad tiene uno o más síntomas gastrointestinales. La mayor parte (70%) acusó de presentar síntomas gastrointestinales superiores, siendo dispepsia de tipo dismotilidad y síntomas de reflujo las manifestaciones más frecuentes. (Massironi, 2019)

La incidencia de neoplasias gástricas es mayor en pacientes con GAA comparado con el resto de la población. Estudios prospectivos han demostrado que del 4-9 % de pacientes con GAA o su forma más severa, AP, presentan tumores

carcinoides gástricos con una frecuencia 13 veces mayor que los pacientes control. Además, hay una predisposición en más del 10% de pacientes con atrofia gástrica y metaplasia intestinal de desarrollar adenocarcinomas gástricos. (Minalyan, 2017)

2.5. **ALTERACIONES HEMATOLÓGICAS**

Como se mencionó anteriormente la GAA conduce a mala absorción de Fe y/o VitB12, con alteraciones hematológicas posteriores que podrían representar la única manifestación clínica. En un gran estudio de cohorte (Lenti & Lahner & Bergamaschi, 2019) con GAA histológicamente comprobada, que incluyó 654 pacientes adultos (relación mujer/hombre 2,3/1) (edad media $59,2 \pm 13,8$ años), se determinaron recuentos sanguíneos de células, amplitud de distribución eritrocitaria (ADE), concentración de VitB12 y ferritina sérica. Los resultados revelaron que el 48,4% presentó anemia, siendo la AP y la ADH los subtipos más prevalentes, con diferencias relacionadas con el sexo y la edad. La AP fue observada en pacientes masculinos mayores y la ADH fue más frecuente en mujeres y pacientes más jóvenes. Es de destacar que una proporción considerable de pacientes con GAA no anémicos mostraron deficiencias de micronutrientes. Estos hallazgos pueden explicarse por la lenta evolución de GAA, que puede tardar varios años en progresar. Es razonable suponer que la deficiencia de Fe caracteriza las etapas más tempranas de la enfermedad, en las cuales la hipo/aclorhidria causa malabsorción de Fe. Por el contrario, la VitB12 se almacena en grandes cantidades y lleva años desarrollar AP.

La anisocitosis fue el predictor más fuerte de anemia. Curiosamente, el aumento del ADE se asoció a una mayor tasa de mortalidad en la población general.

Este estudio reveló que las alteraciones hematológicas son las principales razones para la sospecha de GAA. (Figura 7)

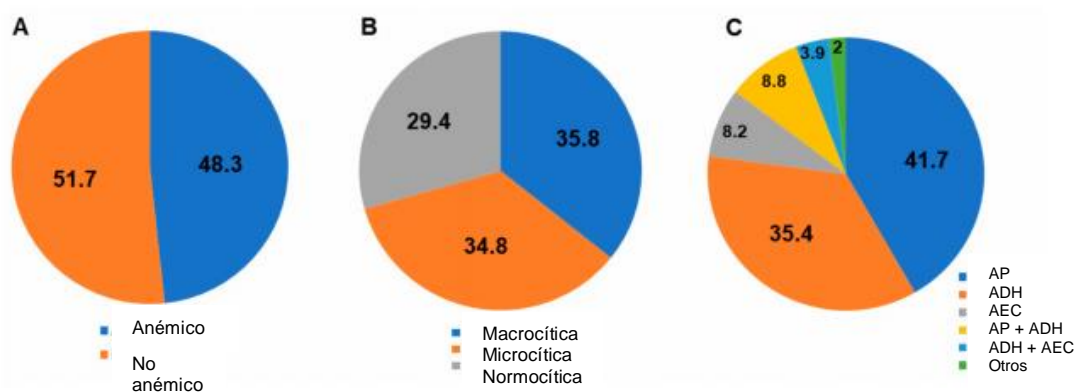


Figura 7. La población del estudio incluye a 654 pacientes adultos que padecen GAA. La figura muestra la proporción de pacientes con y sin anemia (A), la distribución del volumen corpuscular medio (VCM) en pacientes anémicos (B) y subtipos de anemia (C). La categoría “Otros” incluye insuficiencia renal crónica y enfermedades neoplásicas. Abreviaturas: AEC, anemia de enfermedad crónica; ADH, anemia por deficiencia de hierro; AP, anemia perniciosa. (Lenti & Lahner & Bergamaschi, 2019)

Se ha demostrado que el diagnóstico de GAA podría retrasarse en parte debido al desconocimiento del médico, especialmente los gastroenterólogos, de todas las posibles presentaciones clínicas de esta afección. En comparación con la presencia de anemia manifiesta, el retraso en el diagnóstico fue mayor para las alteraciones hematológicas leves, como las macrocitosis y microcitosis sin anemia (<12 meses versus 12-24 meses). Por lo tanto, estas alteraciones sutiles no deben pasarse por alto y deben provocar nuevas investigaciones, comenzando por las pruebas serológicas para GAA. Según este estudio, se debe descartar GAA en todos los casos de deficiencia de VitB12 y en el caso de ADH inexplicada. (Lenti & Lahner & Bergamaschi, 2019)

2.6. DIAGNÓSTICO

Las pruebas diagnósticas utilizadas para el screening y confirmación de GAA son: estudios serológicos, endoscopia, que se ha utilizado para el diagnóstico de GAA solo con el fin de obtener muestras para una biopsia y la histopatología, siendo ésta la gold standard para el diagnóstico de GAA. (Minalyan et.al., 2017)

La detección de anticuerpos específicos ha sido un método efectivo para el screening y confirmación de GAA. Los APCA y AFI son los más utilizados para el diagnóstico de esta enfermedad. Además, debido a la frecuente coexistencia de gastritis inducida por Hp y GAA, se solicitan con regularidad los anticuerpos IgM e IgG anti- Hp (AHP). (Rusak et.al., 2016)

Los APCA son conocidos por tener alta sensibilidad al estar presentes en aproximadamente el 80% de pacientes con GAA y AP pero son poco específicos ya que se encuentran presentes también en otras enfermedades autoinmunes. En pacientes con tiroiditis autoinmune, se detectan APCA con una frecuencia de hasta un 20-30% y además, se ha observado que pacientes con mayores concentraciones de anticuerpos anti-tiroideos tienen niveles más altos de APCA. Los APCA también tienen mayor prevalencia en pacientes con diabetes tipo 1, siendo más común en adultos (13-20%) que en niños (5%), y en otras enfermedades autoinmunes como el vitíligo (15%). (Rusak et.al., 2016)

Los AFI, en contraste, ha demostrado ser menos sensible (~50%) pero más específico para GAA. Se clasifican en dos tipos según su mecanismo de acción. Los tipo I o bloqueadores (los más frecuentes y específicos) impiden la formación del complejo VitB12-FI. Los tipo II o precipitantes inactivan el complejo VitB12-FI, por lo que no se da la absorción en el íleon. (Rusak et.al., 2016)

La determinación de los niveles de GAS es otra prueba diagnóstica que puede encontrarse alterada en pacientes con GAA, debido a la atrofia de la glándula fúndica, que lleva a una producción elevada de la misma por partes de las células-G en el antro. (Soykan et.al., 2012)

Por último, las determinaciones de pepsinógeno I y II (PGI y PGII) como así también, la razón PGI/PGII son frecuentes ante la sospecha de GAA. PGI es secretado específicamente por las células principales de la mucosa oxíntica del cuerpo y fundus gástrico, mientras que PGII es producida por las células principales y células mucosas de toda la mucosa gástrica. Es decir que, ante la atrofia de la mucosa oxíntica, se observará una disminución en los niveles del PGI y por ende estará disminuido también la razón PGI/PGII (<3). Los niveles de PGII, en general no se ven afectados por la atrofia de la mucosa oxíntica. (Minalyan et.al., 2017)

El marcador serológico más sensible para GAA son los APCA. Los AFI, como ya mencionamos anteriormente son más específicos para GAA pero menos sensibles, aunque se ha visto que su sensibilidad aumenta durante la progresión de la enfermedad. Asimismo, varios estudios han demostrado que los APCA tienden a incrementar con la progresión de la enfermedad para luego disminuir sus niveles probablemente por la destrucción de su órgano blanco. Estos anticuerpos específicos pueden preceder los síntomas clínicos por años. (Antico et.al., 2012)

Los niveles de GAS y el PG no son específicos de diagnóstico de GAA pero pueden predecir el nivel de la atrofia. Una combinación de APCA y AFI con AHp y la determinación de niveles de GAS y PG es denominado “Panel Gástrico” (Biohit ®) o “biopsia serológica” recomendado como test no invasivo para diagnóstico de atrofia gástrica. (Kulnigg-Dabsch, 2016; Antico et.al., 2012)

En un estudio clínico realizado por Antico et.al. (2012), se estudiaron a 181 pacientes (19 de sexo masculino y 162 de sexo femenino; con edades comprendidas entre 25-81 años) con diagnósticos de: anemia microcítica por deficiencia de Fe refractaria al tratamiento (39,8%); anemia macrocítica por deficiencia de VitB12 (60,2%), ambas condiciones clínicas asociadas a GAA. Ninguno de los pacientes manifestó sangrado gastrointestinal ni metrorragias, en el caso de pacientes femeninas, tampoco hepatopatías, enfermedad intestinal crónica u otras enfermedades causantes de malabsorción. En todos los pacientes, el análisis microscópico del frotis de SP presentó una moderada anisopoiquilocitosis y en el 67% de los casos, anemia macrocítica e hipersegmentación de neutrófilos. A los 181 pacientes, se les realizó los siguientes marcadores serológicos: APCA, AFI, AHp y GAS y se les efectuó, una endoscopia gastroduodenal a aquellos pacientes con APCA y AFI positivos. De los 181 pacientes, 83 (45,8%) mostraron positividad para APCA, de los cuales 14 (16,8%) también presentaron AFI positivos. A estos 83 pacientes se les realizó la endoscopia, y se los dividió en 4 grupos de acuerdo a los resultados histológicos encontrados. Grupo 1: 30 (36%) pacientes con un perfil histológico de gastritis atrófica crónica, la serología mostró altas concentraciones de APCA, GAS elevada, AFI negativo y presencia de AHp en el 26% de los casos; Grupo 2: 14 (17%) pacientes con atrofia gástrica metaplásica, lesión histológica más severa y extensa que la observada en el grupo 1, mostró APCA positivo pero en menor concentración que grupo 1, GAS elevada, AFI positivo y ausencia de AHp; Grupo 3: 18 (22%)

pacientes con gastritis linfocítica inespecífica, mostró APCA moderadamente elevada, GAS normal, AFI negativo y presencia de AHp en el 21% de los casos; Grupo 4: 21 pacientes (25%) pacientes con gastritis atrófica multifocal, mostró APCA escasamente elevada, AFI negativo, GAS normal y todos positivos para AHp.

Como resultado, se pudo observar que niveles de GAS normales y AFI negativos tiene un alto valor predictivo negativo para lesiones autoinmunes de la mucosa gástrica, como se ha demostrado correlacionando la histología con los resultados del laboratorio en los grupos 3 y 4; solo presentaron niveles altos de APCA pero no mostraron lesiones características de GAA en el epitelio gástrico. Por el contrario, el aumento de GAS y la positividad para AFI, en asociación con niveles elevados de APCA, fueron altamente predictivos, como se puede observar en los resultados obtenidos de los grupos 1 y 2.

La GAA es una enfermedad frecuentemente asintomática que puede causar atrofia de la mucosa gástrica y que en el 10% de pacientes aproximadamente, puede evolucionar a tumores carcinoides o adenocarcinoma.

Se pudo concluir entonces que, en ausencia de síntomas clínicos, solo el uso razonable de pruebas de laboratorio posibilita, la clasificación de pacientes con sospecha de GAA en posibles candidatos para la examinación histológica. El perfil de APCA, AFI, y GAS como marcadores inmunológicos y bioquímicos puede ser estimado como una auténtica “biopsia serológica” considerando que la “hipergastrinemia” identifica el daño de la mucosa gástrica y la presencia de auto-anticuerpos pone en evidencia el origen de la agresión. (Antico et.al., 2012)

CAPITULO 3: LA FASE FINAL: ANEMIA PERNICIOSA

3.1. ASPECTOS GENERALES

La anemia megaloblástica que aparece en la fase final de la GAA se conoce como anemia perniciosa (AP). Los criterios diagnósticos que definen a la AP, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), son: Hb <13 g/dL en hombres y <12 g/dL en mujeres, VCM \geq 100 fL y VitB12 sérica <200 pg/mL, además de la presencia concomitante de GAA (cuyo criterio de diagnóstico es la evidencia histológica de atrofia gástrica) y el déficit de FI. (Sun et.al., 2016)

La AP es más frecuente en personas de edad avanzada, aunque aparece hasta en el 50% en pacientes con edades por debajo de los 60 años. Se ha considerado, una enfermedad que afectaba mujeres mayores de 60 años nacidas en el norte de Europa, sin embargo, estudios realizados en los últimos años confirman que la AP puede presentarse en personas de cualquier raza, sexo, edad y continente (Miceli et.al, 2012). En la población adulta general, se estima una prevalencia del 0,15 %, aunque probablemente esté subestimada, y su incidencia aumenta con la edad.

A pesar de que el tratamiento de la AP es sencillo y fácilmente disponible, su diagnóstico puede ser muy difícil debido a la existencia de numerosos imitadores morfológicos al realizar el examen de frotis en sangre periférica, presentaciones clínicas inusuales e innumerables y por las sensibilidades y especificidades variables de los APCA y AFI. (Thien Oh, 2017)

Hay dos hechos claves que confirman la existencia de una base genética, en la fisiopatología de la AP. Primero, AP tiene un vínculo familiar, alrededor del \leq 19% de los pacientes tienen un miembro de la familia con AP. Por otro lado, se ha descrito la asociación de AP con dos haplotipos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo II: HLA-DRB1*03 y HLA-DRB1*04, genotipos también vinculados a otras enfermedades autoinmunes como tiroiditis autoinmune y diabetes mellitus tipo I, lo cual explica la fuerte asociación entre éstas enfermedades. Y además apoya el concepto de que la autoinmunidad puede jugar un papel importante en AP. (Wafa Ammouri et al., 2020)

3.2. ALTERACIONES HEMATOLÓGICAS

Debido al déficit de factores vitamínicos esenciales para la síntesis de ADN, en este caso la VitB12, aparece un trastorno madurativo de las tres series hematopoyéticas. Existe una disociación madurativa entre el núcleo y el citoplasma debido a un retraso en el alargamiento de la fase S de la mitosis. El trastorno de la serie eritropoyética se denomina megaloblastosis (macrocitosis y anemia). La eritropoyesis ineficaz, que constituye el mecanismo fisiopatológico principal de la anemia megaloblástica, obedece al aborto medular de los precursores eritroides antes de finalizar el proceso de maduración. La hemólisis secundaria es consecuencia de la destrucción periférica de los eritrocitos defectuosos que lograron alcanzar la maduración megaloblástica. (Bizzaro & Antico, 2014; Green, 2017)

La AP es una anemia macrocítica saturada ($VCM > 100$ fl) que presenta cambios morfológicos característicos en las células de la SP y de la MO.

En el frotis se observan macroovalocitos y una marcada anisopoiquilocitosis reflejado por el aumento de ADE. En general, la severidad de los cambios morfológicos de los GR se corresponde con el grado de la anemia. Cuando el hematocrito (Hto) cae por debajo del 20%, algunos megaloblastos pueden aparecer en SP. La presencia de inclusiones eritrocitarias es bastante frecuente, pudiendo observarse: punteado basófilo (agregados de ribosomas), corpúsculos de Howell-Jolly (restos de ADN) y anillos de Cabot (restos de membrana nuclear) como consecuencia de la diseritropoyesis existente. (Figura 8)

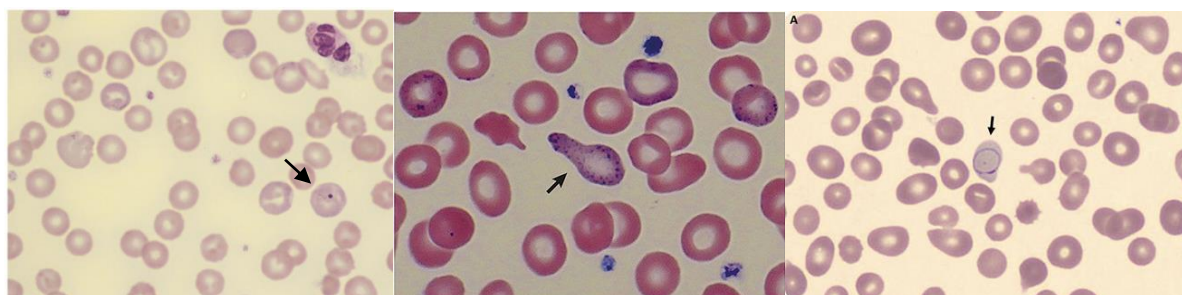


Figura 8. Inclusiones eritrocitarias en sangre periférica (100x). 1) Cuerpos de Howell-Jolly. (Bain, 2017) 2) Punteado Basófilo (Kang et.al, 2019) 3) Anillos de Cabot (Goubeaux & Li, 2018)

La deficiencia de VitB12 causa hiperhomocisteinemia, disminución de niveles de metionina en plasma y aciduria metilmalónica. Esto está asociado a la activación plaquetaria, generación de especies reactivas del O₂, disfunción endotelial, aumento de la expresión del factor tisular y activación de la coagulación. Se cree que las combinaciones de estos factores conducen a la hemólisis intravascular y por ende a la aparición de esquistocitos en SP. (Buess & Germann, 2020)

El recuento absoluto de reticulocitos se encuentra disminuido por la eritropoyesis inefectiva, siendo la médula arregenerativa. (Green, 2017) La macrocitosis podría ser la evidencia más temprana del proceso megaloblástico según un estudio realizado por Seynabou et.al. (2016)

La leucopenia y trombocitopenia son frecuentes, pero rara vez causan complicaciones clínicas. Los neutrófilos típicamente muestran un mayor tamaño e hipersegmentación nuclear (pleocariocitos) más allá de los 3-5 lóbulos que presentan habitualmente. Si se observa en SP más del 5% de neutrófilos con 5 lóbulos o al menos uno con 6 o más, se considera que hay neutrófilos hipersegmentados. (Figura 9) En un estudio realizado por Green R (2017), se describió a la presencia de neutrófilos hipersegmentados como un signo temprano de megaloblastosis y los mismos pueden persistir por varios días después del tratamiento. Sin embargo, no parecen ser un indicador muy sensible en deficiencias leves de VitB12. Las PLT presentan distintos tamaños (anisoplaquetosis) y pueden ser funcionalmente anormales. (Green, 2017; Bizarro, 2014)

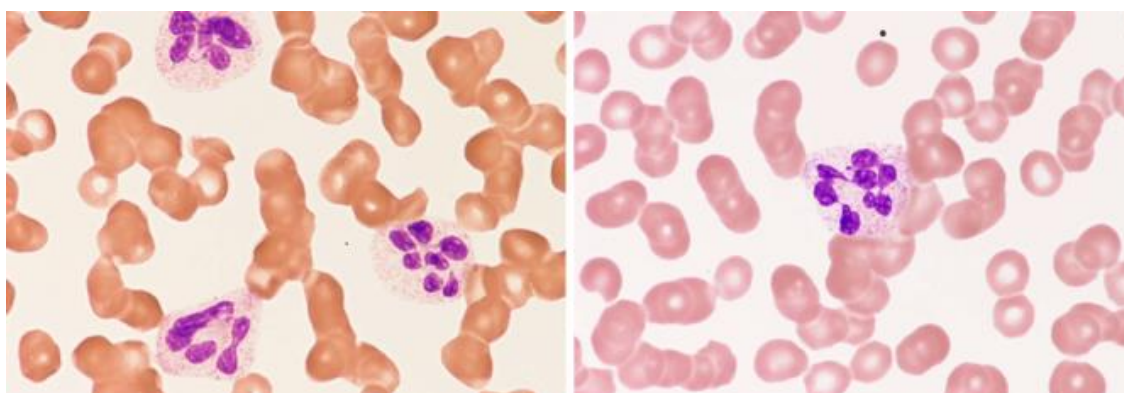


Figura 9. Neutrófilos hipersegmentados (100x) (Okazaki et.al, 2018)

La MO en la AP es hipercelular. La serie eritroide es hiperplásica (relación mielo-eritroide menor a 1), con signos de eritropoyesis ineficaz, reflejo de la destrucción intramedular de los GR. Los eritroblastos son de gran tamaño, con núcleo inmaduro y cromatina laxa. Éstas características reflejan la disociación o asincronismo madurativo núcleo-citoplasmático descrita por Ehrlich, a los cuales denominó megaloblastos. Existe un predominio de proeritroblastos y eritroblastos basófilos sobre el resto creando la apariencia de un arresto madurativo. En la serie mieloide se evidencia la presencia de metamielocitos y cayados gigantes, muy característicos de la megaloblastosis. (Figura 10.) Los megacariocitos suelen presentar un tamaño mayor de lo normal con aumento del número de sus núcleos (hiperploide); algunas veces se observan lóbulos separados en el núcleo y ausencia de granulación citoplasmática. (Green, 2017; Rojas & Oo, 2015)

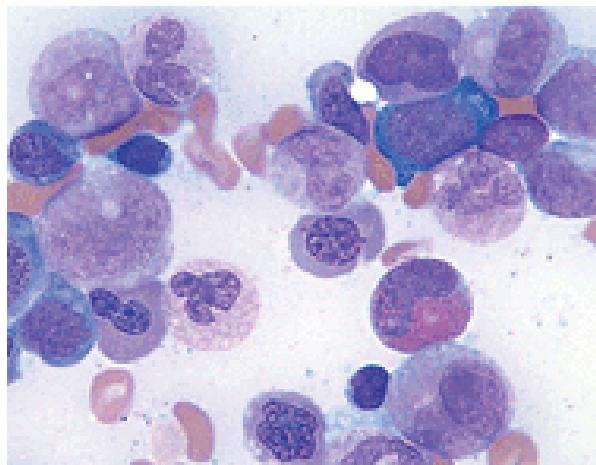


Figura 10. Imagen de MO de un paciente con AP. Médula hipercelular con megaloblastos, disociación madurativa núcleo-citoplasma y metamielocitos y neutrófilos en cayado gigantes (100x). (Socha et.al, 2020)

Los dilemas diagnósticos pueden ocurrir cuando los pacientes con AP presentan niveles de VitB12 espurios o normales, anemia normocítica o microcítica, macrocitosis no anémica, anemia hemolítica autoinmune (AHAI), microangiopatía pseudo-trombótica, tromboembolismo asociado a hiperhomocisteinemia, pseudoleucemia, falla de la MO, sideroblastos del anillo en la MO y manifestaciones neurológicas sin anemia o macrocitosis. A continuación, se hará una descripción general de las diferentes presentaciones clínicas de la AP.

AP que se presenta con niveles espurios normales o altos de VitB12

Un nivel de VitB12 en suero por debajo de 200 pg/ml tiene una buena sensibilidad para la detección de deficiencia de ésta vitamina. Sin embargo, se han presentado reportes (Yang & Cook 2012) de resultados normales de VitB12 falsos cuando se evaluó el suero de pacientes con AP. Esto se ha atribuido a la posibilidad de que niveles altos de AFI bloqueadores interfieran con el ensayo. En la actualidad, los ensayos de vitamina B12 se realizan principalmente en autoanalizadores que aplican un método basado en la unión competitiva de la VitB12 sérica con el FI del reactivo. (Thein Oo, 2017)

AP que presenta anemia normocítica o microcítica

La macrocitosis está ausente en aproximadamente el 30% de los pacientes con AP. Cualquier enfermedad que cause microcitosis, por ejemplo, ADH, si coexiste con AP, puede provocar anemia normocítica. En escenarios extremos, la AP puede incluso presentarse con microcitosis. Aproximadamente el 20.7% de los pacientes con AP tienen ADH coexistente al momento del diagnóstico. Otro 22.3% de los pacientes con AP desarrollan ADH entre un mes y 14 años después. (Thein Oo, 2017)

Otros autores (Thein Oo, 2017) han encontrado que el 42% de los afroamericanos y sudafricanos con AP no tienen macrocitosis y que algunos presentaron ADH después del reemplazo de VitB12. Además, se observó enmascaramiento de la macrocitosis por presencia de α -talasemia en 5 de cada 6 afroamericanos con AP, esto provocó la necesidad de vigilar aquellos pacientes afroamericanos con AP que podrían presentar microcitosis, siendo de gran importancia evaluar el perfil de Fe sérico.

Además de los hallazgos del frotis de SP relacionados con la AP, se podrían evidenciar otras características: la presencia de glóbulos rojos microcíticos, hipocrómicos podrían sugerir ADH coexistente, mientras que la presencia de dianocitos, una talasemia coexistente. (Thein Oo, 2017)

AP que presenta macrocitosis no anémica

La macrocitosis es un indicio para la sospecha de AP. Algunos pacientes con AP pueden presentar macrocitosis no anémica durante varios meses antes de que se haga el diagnóstico de AP. La primera descripción de macrocitosis no anémica debido a AP se remonta a 1964 cuando Hattersley (Thein Oo, 2017) describió a un hombre de 60 años con síntomas neurológicos, Hb de 15.1 g / dL y VCM de 110 fL. El VCM se normalizó después del tratamiento con VitB12. Además, otros autores (Thein Oo, 2017) informaron 4 casos de AP que presentaron macrocitosis y Hb normal o ligeramente disminuida. Dos de los pacientes desarrollaron neuropatía periférica leve que no revirtió con el tratamiento con VitB12 por la demora en el diagnóstico. En una serie de 11 pacientes con AP (Thein Oo, 2017), cuatro tuvieron macrocitosis no anémica durante 2 a 5 años antes de llegar al diagnóstico de AP. Hall, en 1981, (Thein Oo, 2017) también informó sobre 6 pacientes con macrocitosis no anémica que fueron diagnosticados con AP entre 3 y 31 meses después. Muchos de esos pacientes desarrollaron síntomas y signos neurológicos; sin embargo, los síntomas disminuyeron después del tratamiento.

AP que presenta anemia hemolítica autoinmune (AHA)

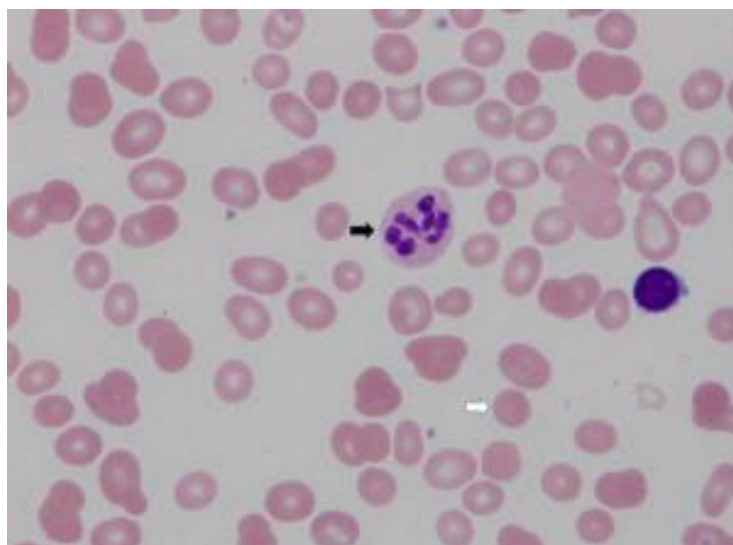


Figura 11. Frotis de sangre de un paciente con anemia perniciosa y anemia hemolítica autoinmune (por anticuerpos calientes). Muestra un neutrófilo hipersegmentado (flecha negra) y un microesferocito (flecha blanca). (100X) (Thein Oo, 2017)

La hemólisis está presente en aproximadamente el 1.5% de los pacientes con deficiencia de VitB12 que se manifiesta por aumento de bilirrubina indirecta, disminución de haptoglobina plasmática e incremento de LDH principalmente debido a la eritropoyesis ineficaz. Aunque es raro, los pacientes con AP manifiestan tener AHAI coexistente. AHAI puede presentarse de forma concomitante o estar precedida una por otra. Un examen cuidadoso del frotis de SP permite, revelar la presencia de microesferocitos (Figura 11). Mientras que la eritropoyesis ineficaz se presenta con la prueba de Coombs negativa, los pacientes con AP y AHAI se presentan con la prueba de Coombs directa positiva (con IgG +/- complemento C3). Se informaron en la literatura más de 20 casos de AHAI asociada a AP. La observación del frotis de sangre periférica reveló la presencia de microesferocitos junto a los macroovalocitos y neutrófilos hipersegmentados. (Thein Oo, 2017)

AP que presenta microangiopatía pseudo trombótica (Pseudo-MAT)

Se pueden observar esquistocitos en las anemias megaloblásticas, como resultado de la fragilidad del citoesqueleto del eritroblasto, lo que refleja la gravedad de la diseritropoyesis (Figura 12). En una serie de 201 pacientes con deficiencia de VitB12, el 2.5% de los pacientes presentaron pseudo-MAT. Andres et.al. (Thein Oo, 2017) informaron 6 casos (4 con AP) de deficiencia de VitB12 que presentaban pseudo-MAT, caracterizados por hemólisis, trombocitopenia y presencia de esquistocitos. La concentración de Hb, el VCM y el recuento de PLT fueron 6,8 g / dL, 113 fL, 70000/mm³, respectivamente. Varios pacientes con AP con pseudo-MAT han sido diagnosticados erróneamente y tratados con transfusiones de plasma y/o intercambio (Yousaf et al., 2017). Noel y col (2013) informó que los pacientes con pseudo-MAT tenían niveles de LDH y recuentos de plaquetas más altos, recuento de reticulocitos y neutrófilos más bajos, comparados con pacientes con púrpura trombocitopénica trombótica verdadera.

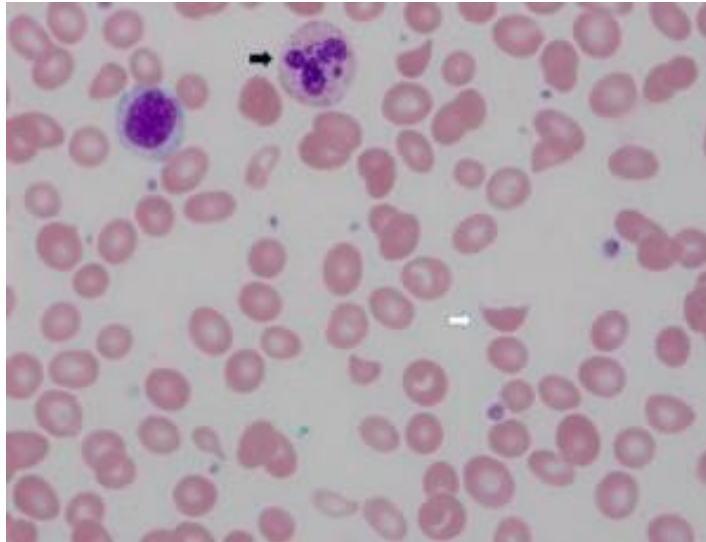


Figura 12. Frotis de sangre de un paciente con anemia perniciosa y microangiopatía pseudo-trombótica. Muestra un neutrófilo hipersegmentado (flecha negra) y un esquistocito (flecha blanca). (100X) (Thein Oo, 2017)

AP que presenta tromboembolismo asociado a hiperhomocisteinemia

La homocisteína es un aminoácido sulfurado proveniente del metabolismo de la VitB12 y el AF. La hiperhomocisteinemia se puede encontrar en la deficiencia de VitB12 y es un factor de riesgo reconocido para tromboembolismo. McCully (Thein Oo, 2017) estableció por primera vez la relación entre hiperhomocisteinemia y aterosclerosis vascular. Se cree que está implicado el daño oxidativo del endotelio, alteraciones en las propiedades coagulantes de la sangre, regulación vasomotora alterada dependiente del endotelio. Además de disminución de la unión de antitrombina III al sulfato de heparina endotelial, aumento de la afinidad entre las lipoproteínas y la fibrina, inducción de la expresión del factor tisular. Como también, la inhibición de la inactivación del factor V por la proteína C activada y la reactividad plaquetaria alterada. Muchos casos de tromboembolismo debido a hiperhomocisteinemia relacionada con la AP se han publicado en la literatura. Algunos pacientes tenían Hb normal en el momento de la tromboembolia. Los pacientes con tromboembolismo asociado a AP se manejaron con éxito con anticoagulación terapéutica y suplementos de VitB12. (Thein Oo, 2017)

AP que presenta síndrome simulado de "pseudoleucemia"

La deficiencia de VitB12 con o sin deficiencia simultánea de AF ha sido reconocida durante mucho tiempo como la etiología de los cambios morfológicos en la hematopoyesis que se asemejan a los observados en la leucemia aguda. La presentación clínica puede debutar con hepatoesplenomegalia, pancitopenia y leucoeritroblastosis. Los pacientes pueden presentar infecciones oportunistas y sintomatología neurológica severa, lo que hace que el diagnóstico sea más desafiante. Los hallazgos observados en el frotis de SP son diversos: anisocitosis, macrocitosis, fragmentación, pancitopenia, desviación a la izquierda y GR nucleados. Otras características de laboratorio observadas en la leucemia también pueden estar presentes en la deficiencia de VitB12 grave: LDH sérica elevada e hiperbilirrubinemia, cambios atribuidos a la eritropoyesis ineficaz.

La morfología de MO en esta entidad, puede mostrar cambios variables, relacionados con una hematopoyesis anormal y superposición con las características observadas en los trastornos mieloides primarios. Algunos de esos cambios incluyen hipercelularidad con un aumento de la relación mieloide-eritroide y detención de la maduración de precursores de granulocitos en diferentes etapas. Por lo general, se observan eritroblastos gigantes y dismórficos, los cuales se consideran patognomónicos de la deficiencia de VitB12, aunque también se pueden ver en ciertas leucemias, como la leucemia eritroide. Algunos autores (Thein Oo, 2017) han informado que ciertas variaciones en la distribución citoplasmática de los gránulos en los promielocitos pueden ayudar a diferenciar entre las etiologías benignas y algunos tipos de leucemia mieloide, sin embargo, esas observaciones no han sido ampliamente validadas en otros trastornos malignos específicos de MO.

AP que se presenta con síndrome similar a falla de la médula

Entre la amplia variedad de presentaciones hematológicas, la pancitopenia y la insuficiencia de la MO son quizás las manifestaciones más difíciles de asociar a la deficiencia de VitB12. Diferentes estudios de cohortes han reportado frecuencias variables de pancitopenia en pacientes con deficiencia de VitB12 grave, con tasas que

van del 5 al 37%. Por el contrario, los estudios prospectivos que evalúan la etiología de la pancitopenia en la población adulta, han encontrado que la deficiencia de VitB12 es el diagnóstico subyacente en hasta el 60% de los casos. (Thein Oo, 2017)

Existen múltiples razones que dificultan la distinción entre el fallo medular primario y el asociado a la deficiencia de VitB12. Esas razones están relacionadas y no se limitan a: diagnósticos coexistentes, otras deficiencias concurrentes de nutrientes (es decir, Fe, AF) y la baja precisión diagnóstica (sensibilidad) de los inmunoensayos de VitB12 en suero. Una evaluación consecutiva de 255 casos diagnosticados con síndrome mielodisplásico (SMD) evaluados y tratados en un gran centro de trasplante, reveló que aproximadamente el 27% de los casos que mostraron características morfológicas de SMD de bajo riesgo con cariotipos normales tenían, de hecho, deficiencia de VitB12 y todos respondieron bien al tratamiento parenteral con VitB12. (Thein Oo, 2017)

La presencia de anomalías inmunofenotípicas, evaluadas por citometría de flujo y citogenética junto con una hematopoyesis clonal anormal se utilizan como herramientas de diagnóstico para trastornos primarios de MO. Desafortunadamente, estas anomalías no siempre están presentes. En la deficiencia de VitB12 grave, se pueden ver anormalidades fenotípicas y citogenéticas, incluidos los cambios reversibles de fragilidad cromosómica. Algunos autores (Sutton & Mba, 2017) han sugerido la observación del aumento de hematogonias en la deficiencia de VitB12 grave, en comparación con el SMD como una característica que distingue las causas nutricionales de las causas malignas de falla medular.

AP que presenta sideroblastos anillados

La presentación de la deficiencia de VitB12 como anemia sideroblástica es un evento poco frecuente. Se desconoce la incidencia, y se estima que se asocian a otras deficiencias nutricionales, como niveles bajos de folato y/o piridoxina, en hasta 60-80% de los casos de anemia sideroblástica secundaria. En algunos casos, el alcoholismo, la malabsorción y las restricciones y/o deficiencias alimentarias graves son las causas de las deficiencias nutricionales; pero en muchos otros, aunque exhiben un bajo nivel de nutrientes, no se identifica la etiología primaria del déficit. Por

lo tanto, la evaluación de sideroblastos en anillo con o sin anemia debe incluir la evaluación del estado de VitB12, AF y piridoxina incluso si la sintomatología sugestiva de malabsorción está ausente. (Thein Oo, 2017)

3.3. **ALTERACIONES BIOQUIMICAS**

La VitB12 es necesaria para la síntesis adecuada de ADN y división celular de las células hematopoyéticas. Sin las reservas adecuadas, los precursores nucleados de las líneas celulares hematopoyéticas no pueden madurar lo que lleva a la anemia megaloblástica. Como las células precursoras son incapaces de madurar, se produce un arresto celular, lo que conduce a la muerte intramedular. La LDH se libera durante la destrucción de glóbulos rojos nucleados. Por lo tanto, la hemólisis intramedular de glóbulos rojos inmaduros, puede conducir a altos niveles de LDH. Por otro lado, como la elevación de la bilirrubina resulta del catabolismo del grupo hemo, la hemólisis de precursores eritroides, que sintetizan poca hemoglobina, puede resultar en un ligero aumento en los niveles de bilirrubina. Es decir que los niveles de LDH suelen ser más elevados en relación a los niveles de bilirrubina indirecta. La haptoglobina puede estar disminuida también. Hay un aumento en los niveles de eritropoyetina sérica, pero el aumento es relativamente leve, en comparación con otras anemias de gravedad similar. (Buess & Germann, 2020)

Una característica que surge de la eritropoyesis ineficaz es un bloqueo en la utilización de Fe, que resulta en un aumento de los niveles séricos de Fe y ferritina, pero con niveles aumentados del receptor de Tf. (Green, 2017; Cattani, 2011)

Aunque la determinación de VitB12 sérica (valores normales: 200-900 pg/mL) se utiliza como primera línea para la deficiencia de VitB12, la medición utilizada en forma aislada tiene baja sensibilidad y especificidad para una detección confiable. En muchos pacientes con deficiencia de VitB12 hay falsos negativos y esto se correlaciona a la distribución de la VitB12 entre sus dos proteínas de unión. Normalmente la fracción mayoritaria (70-90%) de la VitB12 circulante está unida a la HC la cual no está disponible para la entrega inmediata a la célula y el otro 10-30% está unido a la TC, que es la proteína de transporte funcional de la VitB12. Puede haber falsos negativos por ejemplo en síndromes mieloproliferativos donde la HC

puede estar aumentada o en deficiencia de TC congénita, en cuyo caso, lo óptimo sería valorar la holotranscobalamina (HoloTC) que es la determinación específica de la fracción funcional de la VitB12. (Green, 2017; Rannelli & Watterson & Pandya, 2014)

Otros marcadores importantes son el AMM y la Hcy. Los niveles elevados de AMM y Hcy son indicadores sensibles de la deficiencia tisular de VitB12, siendo la AMM específica para VitB12. Se encuentran aumentados en más del 90% de los pacientes con deficiencia de VitB12 y aumentan antes de que la B12 sérica disminuya a niveles subnormales, aunque no son de uso habitual debido a su costo. Ambos se elevan como productos acumulados por la carencia de los cofactores derivados de la VitB12, necesarios para el paso de metilmalonil-CoA a succinil-CoA y de Hcy a Met respectivamente. La medición de AMM es importante para distinguir entre deficiencia de VitB12 y de AF, mientras que Hcy aumenta en ambas. (Bizzaro & Antico, 2014)

En un estudio realizado por Aparicio et.al. (2015) donde analizaron diferentes trabajos relacionados con la determinación de la VitB12, encontraron que sólo cuatro autores de un total de 69 utilizaron la VitB12 como marcador único, mientras que el resto de ellos hicieron una combinación de marcadores. (Valente et al; Palacios et al)(24). El biomarcador más incluido fue Hcy (78%) seguido por AMM (65%), AF en suero (59%), HoloTC (30%) y AF eritrocitario (21%). Ambos marcadores del AF (en suero y eritrocitario) deberían medirse para evaluar si coexiste la deficiencia de AF y de VitB12.

3.4. **ALTERACIONES NEUROLÓGICAS**

La deficiencia de VitB12 produce una desmielinización discontinua, difusa, progresiva de los cordones dorsales y laterales de la médula espinal y la corteza cerebral. Los rasgos característicos de la disfunción neurológica son su distribución simétrica y distal, fundamentalmente en manos y pies. (Rannelli & Watterson & Pandya, 2014)

Los síntomas más tempranos y comunes son parestesias, entumecimiento y pérdida de la sensibilidad. Es habitual la pérdida del sentido de posición y de la vibración, especialmente a las altas frecuencias. Puede haber disminución de los

reflejos tendinosos profundos, pero la hiperreflexia y la espasticidad sobrevienen cuando se involucran los cordones laterales. Comúnmente, se desarrollan trastornos de la marcha que pueden llegar hasta la ataxia. (Rannelli & Watterson & Pandya, 2014; Sun, 2016)

Las alteraciones mentales van desde la irritabilidad a la demencia, que se asemeja a la enfermedad de Alzheimer, y puede aparecer psicosis, esquizofrenia paranoide e incluso el coma. Puede presentarse también somnolencia, alteración del gusto, del olfato y de la visión, con ocasional atrofia óptica. (Green, 2017)

La implicancia del sistema nervioso central no se correlaciona totalmente con el grado de anemia. En casos excepcionales, se encuentra neuropatía pronunciada en ausencia de cualquier anormalidad hematológica y las afectaciones neurológicas pueden progresar mientras los valores hematológicos permanecen normales. En algunos casos, estos fenómenos pueden deberse al tratamiento inadecuado con AF. (Rannelli & Watterson & Pandya, 2014)

3.5. **TRATAMIENTO**

En el tratamiento de la deficiencia de VitB12 se utilizan convencionalmente 2 preparados farmacológicos: la cianocobalamina y la hidroxicobalamina, que generalmente son administrados por vía intramuscular. En cuanto a la aplicación del tratamiento, existen diferentes esquemas terapéuticos. Uno de los más utilizados consiste en la administración de 1000 µg diarios durante 2 semanas, luego semanalmente hasta la normalización del hematocrito y continuar mensualmente por tiempo indefinido. En el caso de pacientes que presenten manifestaciones neurológicas, el tratamiento intensivo inicial se prolongará durante unos 6 meses. (Green, 2017)

La anemia megaloblástica causada por deficiencia de B12 responde al tratamiento con un aumento del recuento de reticulocitos a los 5 días post tratamiento y generalmente con la corrección completa de todos los parámetros hematológicos dentro de 4 a 6 semanas. (Green, 2017)

CONCLUSIÓN

Los pacientes con GAA tienen 3-5 veces más riesgo de desarrollar enfermedades autoinmunes (tiroiditis autoinmune, diabetes mellitus tipo 1, vitíligo, enfermedad de Addison y miastenia gravis) que la población general, siendo la asociación más frecuente la tiroiditis autoinmune.

Ante la presencia de una deficiencia de hierro sin sangrado gastrointestinal y refractaria al tratamiento debería no sólo solicitarse estudios que se incluyen en el perfil celíaco para descartar el diagnóstico de enfermedad celíaca, sino también pruebas asociadas a GAA y AP.

La gastritis crónica observada en pacientes con malabsorción de VitB12 aumenta el riesgo de tumores gástricos y adenocarcinoma. Incluso se observa malabsorción de otros micronutrientes esenciales como el Fe. A su vez, las consecuencias neurológicas entre los jóvenes y ancianos se deben, en parte, a un estado de déficit de VitB12, esto revela la importancia de realizar del diagnóstico precoz.

Clásicamente se ha considerado a la AP como una enfermedad que afectaba mujeres mayores de 60 años, sin embargo, estudios de los últimos años confirman que puede presentarse en personas de cualquier raza, sexo, edad y continente.

La GAA y AP con frecuencia se desarrollan lenta y silenciosamente, sumado a la variedad de escenarios clínicos que pueden dificultar su reconocimiento. Es por ello que muchos casos permanecen sin diagnosticar. Sin embargo, las consecuencias clínicas de GAA y AP pueden ser muy graves e irreversibles si no son tratadas a tiempo.

Ciertas alteraciones hematológicas y bioquímicas pueden anteceder el desarrollo del estadio final de la GAA, es decir la AP, por ende, el objetivo de esta revisión es contribuir a la concientización de esta enfermedad cuyo diagnóstico histológico definitivo puede ser precedido por muchos años por un estudio hematológico y un screening serológico confiable y no invasivo.

El principal problema entonces en el diagnóstico de la AP es el sub-diagnóstico si queda solo limitado al estudio por parte de los hematólogos.

BIBLIOGRAFÍA

- ALAMRI BN [et al.]. Efecto de la hiperglucemia sobre los índices de glóbulos rojos. Eur Rev Med Pharmacol Sci Mar 2019; 23 (5): 2139-2150.
- ANDRES M, FERNANDEZ R, FERNANDEZ-DELGADO. Alteraciones hematológicas en las personas con síndrome de Down. Rev Esp Pediatr 2012; 68 (6): 421-423.
- ANTICO A [et al.]. Clinical usefulness of the serological gastric biopsy for the diagnosis of chronic autoimmune gastritis. Clin Dev Immunol 2012; Vol 2012, Art. ID: 520970.
- APARICIO R, PALACIOS G, ALDER M. A review of the cut-off points for the diagnosis of vitamin B12 deficiency in the neral population. Clin Chem Lab Med 2015; 53(8): 1149-59.
- ATALLAH BAYDOUN et.al. Hematological manifestations of celiac disease. Scan Jour Gastroenterol. 2012; 47: 1401–1411
- BAIN BJ. Howell-Jolly bodies in acute hemolytic anemia. Am J Hematol 2017; 92: 473
- BERGAMASCHI G, DI SABATINO A, CORAZZA G. Pathogenesis, diagnosis and treatment of anaemia in immune-mediated gastrointestinal disorders. BJH 2018; 182: 319-329.
- BETESH A [et al.]. Is achlorhydria a cause of iron deficiency anemia? Am J Clin Nutr 2015; 102 (1): 9-19.
- BIZZARO N, ANTICO A, VILLALTA D. Autoimmunity and gastric cáncer. Int J Mol Sci 2018; 19, 377..;
- BIZZARO N. Diagnosis and classification of pernicious anemia. Autoimm Rev 2014; 13: 565-568.
- BIZZARO N., ANTICO, A. Tratamiento de la anemia perniciosa: ¿Cuál es la mejor opción? Autoimn Res 2014; 13 (7): 779.
- BUESS C S, GERMANN A M. Vitamin B12 Deficiency with Pseudothrombotic Microangiopathy and Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: Similarities and Differences. Kans J Med 2020; 13: 46-48.
- CAMASCHELLA C. Iron deficiency. Blood J 2019; 133 (1): 30-39.

CATTAN D. Pernicious anemia. What are the actual diagnosis criteria? *World J Gastroenterol* 2011; 17 (4): 543-544.

CAVALCOLI F, CONTE D, MASSIRONI S. Micronutrient deficiencies in patients with chronic atrophic autoimmune gastritis: A review. *World J Gastroenterol* 2017; 23 (4): 563-572.

DELOUGHERY T. Iron Deficiency Anemia. *Med Clin N Am* 2017; 101; 319-332.

DI SABATINO A, [et al.]. New insights into immune mechanisms underlying autoimmune diseases of the gastrointestinal tract. *Autoimm Rev* 2015; 14, 1161-1169.

FUQUA B, VULPE C, ANDERSON G. Intestinal iron absorption. *J Trace Elem Med and Biol* 2012; 26: 115-119.

GOUBEAUX DL, LI W. Cabot rings and marked anisopoikilocytosis in Imerslund-Gräsbeck syndrome. *Blood* 2018; 131(1): 153.

GREEN R, [et.al.]. Vitamin B12 deficiency. *Nat Rev Dis Primers* 2017; 3:17040.

GREEN R, DENIS M, DWYRE MD, Evaluation of Macrocytic Anemias. *Semin Hematol* 2015; 52 (4): 279-286.

GREEN R. Vitamin B12 deficiency from the perspective of a practicing hematologist. *Blood J* 2017; 129 (19): 2603-2611.

GREEN, R., Y DATTA MITRA, A. Anemias megaloblásticas: nutricional y otras causas. *Med Clin North Am* 2017; 101(2):297–317.

HANNIBAL L, LYSNE V, BJØRKE-MONSEN AL. Biomarkers and Algorithms for the Diagnosis of Vitamin B12 Deficiency. *Frente Mol Biosci* 2016; 3: 27.

HARIZ A, BHATTACHARYA PT. Anemia megaloblástica. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL). StatPearls Publishing, 2020. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537254/#_NBK537254_pubdet

HUNT A, HARRINGTON D, ROBINSON S. Vitamin B12 deficiency. *BMJ* 2014; 349: g5226.

KAHALY G, HANSEN M. Type I diabetes associated autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2016; 15 (7): 644-48.

KANG W [et al.]. A Case of Severe Lead Poisoning with Basophilic Stippling Teardrop Cell. J Korean Med Sci. 2019, 34(50):e320.

KOURY MJ [et al.]. Abnormal erythropoiesis and the pathophysiology of chronic anemia. Blood Review 2014; 28 (2): 49-66.

KUJOVICH JL. Evaluation of anemia. Obstet Gynecol Clin North Am 2016; 43 (2): 247-64.

KULNIGG-DABSCH. Autoimmune gastritis. Wien Med Wochenschr 2016; 166: 424-430.

LAGE A, [et al.]. Anti-parietal cell antibodies and pernicious anemia in patients with type I diabetes mellitus and multiethnic background. Diab Res Clin Pract 2013; 102: 41-43.

LAHNER E [et al.]. Thyro-entero-gastric autoimmunity: pathophysiology and implications for patient management. Best Pract Res Clin Endocrinol Metabol. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2019.101373>

LANIER JB, PARK JJ, CALLAHAN RC. Anemia en adultos mayores. Am Fam Phys 2018; 98 (7): 437-442.

LAZAROWSKI A. Transport of Vitamin-B12. A laberynth of a single entry and multiple incomplete roads. Hematología 2015; Vol 19. 208-221.

LENTI MV, LAHNER E, BERGAMASCHI G. Cell Blood Count Alterations and Patterns of Anaemia in Autoimmune Atrophic Gastritis at Diagnosis: A Multicentre Study. J Clin Med 2019; 8 (11): 1992.

LOPEZ A, [et al.]. Iron deficiency anaemia. Lancet 2016; 387 (10021): 907-16.

MASSIRONI S, [et al.]. The changing face of chronic autoimmune atrophic gastritis: an updated comprehensive perspective. Autoimmun Rev 2019; 18 (3): 215-222.

MERINO A. Alteraciones morfológicas de los eritrocitos. Ed Cont Lab Clin 2014-2015; 20: 41-64.

MICELI E, [et al.]. Características comunes de los pacientes con gastritis atrófica autoinmune. Clin Gastroenterol Hepatol 2012;10 (7): 812-4.

MINALYAN A, [et al.]. Autoimmune atrophic gastritis: current perspective. Clin Exp Gastroenterol 2017; 10 19-27.

MOORE CA , ADIL A. Anemia macrocítica. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2020. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459295/#_NBK459295_pubdet

NAGAO T, HIROKAWA M. Diagnosis and treatment of macrocytic anemias in adults. J Gen Fam Med 2017; 18:200-204.

NOEL N, [et al.]. Hemolysis and schistocytosis in the emergency department: consider pseudothrombotic microangiopathy related to vitamin B12 deficiency. QJM 2013.106(11):1017-1022

NUCIFORA EM, BASACK N. Macrocytosis: causas, diagnóstico diferencial y tratamiento en pediatría y en el adulto. Hematología, Número Extraordinario XXII Congreso, 2015; Vol 19: 222 – 238.

OKAZAKI Y, [et al.]. Hypersegmented Neutrophils in Methotrexate Toxicity. Intern Med. 2018; 57(7): 1055–1056.

ORTEGA CASTRO R, ESCUDERO CONTRERAS A, CALVO GUTIERREZ. Optima utilización del metotretaxo. Semin Fund Esp Reumatol 2013; 14 (1): 24-27

OSBORNE D, SOBCZYNSKA A. Autoimmune mechanisms in pernicious anaemia and thyroid disease. Autoimmun Rev 2015; 14 (9): 763-68.

PHILIPSEN JP, MADSEN KV. Hypo- and hypernatremia results in inaccurate erythrocyte mean corpuscular volumen measurement *in vitro*, when using Sysmex XE 2100. Scan Jour Clin Lab Inv 2015; 75 (7): 588-594.

PIVA E [et al.]. Utilidad clínica de los parámetros de reticulocitos. Clín Med Lab 2015; 35 (1), 133–163.

RANNELLI L, WATTERSON R, PANDYA R. Vitamin B12 deficiency with combined hematological and neuropsychiatric derangements: a case report. J Med Case Reports 2014; 8:277.

ROJAS HERNANDEZ CM, OO TH. Avances en los mecanismos, diagnóstico y tratamiento de la anemia perniciosa. Discov Med 2015; 19 (104): 159-68.

RUSAK E, [et al.]. Anti- parietal cell antibodies- diagnostic significance. Adv Med Scien 2016; 61:175-179.

SALINAS M, [et al.]. Vitamin B12 deficiency and clinical laboratory. *Int J Lab Hem* 2015; 40: 83-88.

SEYNABOU F, FATOU SAMBA D. Biermer anemia: Hematologic characteristics of 66 patients in a clinical hematology unit in Senegal. *Med et Santé Tropicales* 2016; 26:402-407.

SHIPTON MJ, THACHIL J. Vitamin B12 deficiency- A 21st century perspective. *Clinical Med* 2015; 15: 145-50.

SMITH D, WARREN M, REFSUM H. Vitamin B12. *Adv Food Nutri Res* 2018; 83: 215-279.

SOBCZYŃSKA-MALEFORA A, HARRINGTON DJ. Laboratory assessment of folate (vitamin B9) status. *Journal of Clinical Pathology, J Clin Pathol* 2018; 71(11): 949-956.

SOCHA DS [et al]. Severe megaloblastic anemia: Vitamin deficiency and other causes. *Clev Clin J Med* 2020; 87(3):153-164.

SOYKAN I [et al.]. Clinical profiles, endoscopic and laboratory features and associated factors in patients with autoimmune gastritis. *Digestion* 2012; 86: 20-26.

STABLER SP. Vitamin B12 deficiency. *N Engl J Med* 2013; 368:149-160.

STEINBICKER A. MUCKENTHALER M. Out of balance- Systemic iron homeostasis in iron-related disorders. *Nutrients* 2013; 5 (8): 3034-3061.

SUN A, [et al.]. Do all the patients with vitamin B12 deficiency have pernicious anemia? *J Oral Pathol Med* 2016; 45: 23-27.

SUN A, YU-FONG CHANG J, WANG Y. Effective vitamin B12 treatment can reduce serum antigastric parietal cell antibody titer in patients with oral disease. *J of the Form Med Assoc* 2016; 115 (10): 837-844.

SUTTON L, MBA N. Hematogones Detected by Flow Cytometry in a Child with Vitamin B12 Deficiency. *Pediatr Dev Pathol* 2017. 20(2):172-175

TAKAHASHI N, KAMEOKA J, TAKAHASHI N. Causes of macrocytic anemia among 628 patients: mean corpuscular volumes of 114 and 130 fL as critical markers for categorization. *Int J Hematol* 2016; 104:344–357.

TEMA A, [et al.]. Effect of cold agglutinins on red blood cell parameters in a trauma patient: a case report. *Ann Lab Med* 2018; 38 (4): 371-374.

THEIN Oo. Challenging clinical presentations of pernicious anemia *Discov Med* 2017; 24 (131): 107-115.

TOH BH. Diagnosis and classification of autoimmune gastritis. *Autoimmun Rev* 2014; 13(4-5): 459-66.

VARBANOV M, FRAUENSCHLAGER K, MALFERTHEINER P. Chronic gastritis- An update. *Best Practice and Res Clin Gastroenterol* 2014; 28, 1031-1042.

WAFA AMMOURI [et al.] Pernicious Anaemia: Mechanisms, Diagnosis and Management. *EMJ Hematol* 2020; 1(1): 71-80.

YANG DT, COOK RJ. Spurious elevations of vitamin B12 with pernicious anemia. *N Engl J Med* 2012. 366(18):1742-1743

YOUSAF F, [et al.]. Pernicious anemia associated cobalamin deficiency and thrombotic microangiopathy: case report and review of the literature. *Case Rep Med* 2017. Vol 2017, Art ID: 9410727